

Wirkung von Glucuronolacton – Proteomanalysen und Transportstudien an der Blut-Hirn-Schranke

vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doctor rerum naturalium
genehmigte Dissertation von

Diplom-Biologe Patrick Pankert
aus Darmstadt

Berichterstatter: Prof. Dr. H. G. Gassen
Biochemie, TU Darmstadt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. F. Pfeifer
Mikrobiologie, TU Darmstadt

Tag der Einreichung: 16.12.2003
Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.2004

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hans Günter Gassen danke ich besonders für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen sowie für seine freundliche Unterstützung und stete Gesprächsbereitschaft.

Mein spezieller Dank gilt Frau PD Dr. Sabine Wolf für die Überlassung des interessanten Themas und die Anregungen in den Doktorandensitzungen. Weiterhin bedanke ich mich für die Unterstützung durch die Firma Esplora.

Herrn Dr. Gerhard Illing danke ich ausdrücklich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit durch die Dr. Illing-Stiftung.

Frau Prof. Dr. Felicitas Pfeifer danke ich sehr herzlich für die Übernahme des Koreferates.

Frau Dr. Martina Jäger gilt mein besonderer Dank für die gute Betreuungsarbeit und die fachliche Unterstützung. Ferner möchte ich mich auch für die zahlreichen Tipps, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben sowie für ihr stetes Interesse am Arbeitsfortgang bedanken.

Mit Stefan Märten habe ich einen guten Freund im Laufe unserer Promotionszeit gewonnen, der mir jederzeit mit Wort und Tat zur Seite stand. Danke schön.

Thomas Oppolzer möchte ich vor allem für seine stetige Bereitschaft zu fachlichen Diskussionen und Anregungen danken.

Insbesondere danke ich Dominik Jordan für seine Geduld und Hilfsbereitschaft bei der Einführung in die 2D-Gelanalysen und die MALDI-Messungen und Dr. Bernhard Pelzer für die freundliche Unterstützung in der Zellkultur.

Den Mitarbeitern der Firma Esplora und des AK Gassen danke ich für die gute und freundliche Atmosphäre in und außerhalb der Labore. Für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung während des Grundpraktikums oder im Labor danke ich Simone Bartl-Zimmermann und Monika Buchmann.

Ein weiteres Dankeschön gilt meinen Freunden Barbara Puhl und Peter Zimmermann für ihren Beistand vor allem gegen Ende dieser Arbeit.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich dafür, dass sie mich jederzeit unterstützt haben und mir dieses Studium ermöglicht haben.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei Dagmar Gregor für ihr Verständnis, dafür, dass sie immer an mich geglaubt hat sowie für alles andere.

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	Die Blut-Hirn-Schranke	3
2.1.1	Aufbau der Blut-Hirn-Schranke	3
2.1.2	Transportprozesse an der Blut-Hirn-Schranke	5
2.1.3	Stoffwechsel an der Blut-Hirn-Schranke	8
2.1.4	Hirnkapillarunabhängige Systeme mit Schrankenfunktionen	8
2.2	„Functional Food“	9
2.2.1	Koffein	10
2.2.2	Taurin	13
2.2.3	Glucuronolacton	16
2.3	Aufgabenstellung und Ziel dieser Arbeit	20
3	MATERIAL	21
4	METHODEN	28
4.1	Allgemeine Puffer und Lösungen	28
4.2	Charakterisierung von Glucuronolacton	28
4.2.1	Bestimmung der spezifischen Rotation	28
4.2.2	Derivatisierung von Glucuronolacton mit PMP	29
4.2.3	HPLC-Analysen	29
4.3	Proteinchemische Methoden:	31
4.3.1	Proteinbestimmung	31
4.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
4.3.3	Färbemethoden für SDS-Polyacrylamidgele	32
4.3.4	Differentielle Detergenz Fraktionierung	34
4.3.5	Acetonfällung von Proteinen	36
4.4	Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE)	37
4.4.1	Erste Dimension: isoelektrische Fokussierung	37
4.4.2	Reduzierung und Alkylierung von Cysteinresten	39
4.4.3	Zweite Dimension: SDS-Gelelektrophorese	40

4.4.4	Spotanalyse mit Z3	40
4.4.5	Spotanalyse mit PDQuest™ 7.0	41
4.4.6	Isolierung von Proteinspots aus Polyacrylamidgelen	43
4.4.7	Hydrolyse von Proteinen	44
4.5	MALDI-TOF-MS	44
4.5.1	Probenvorbereitung	45
4.5.2	Peptidanreicherung mittels ZipTip:	45
4.5.3	Peptidanreicherung ohne ZipTip:	46
4.5.4	MALDI-MS-Messung	46
4.5.5	Datenbankabfragen	47
4.6	Polymerase-Kettenreaktion - PCR	48
4.7	Zellkulturtechniken:	48
4.7.1	Häufig verwendete Medien	48
4.7.2	Isolierung von Schweinehirndothelzellen (BMEC) aus Schweinehirnhälften	49
4.7.3	Beschichtung von Zellkulturgefäßen	51
4.7.4	Kultivierung von BMEC	51
4.7.5	Subkultivierung von BMEC	51
4.7.6	Toxizitätstest	52
4.7.7	Immuncytochemische Färbungen	52
4.7.8	Transwellstudien am BHS-Modell	53
4.7.9	Transport von Glucuronolacton	54
4.7.10	Widerstand und Permeabilität von Na-Fluorescein mit und ohne Glucuronolacton	55
5	ERGEBNISSE	56
5.1	Allgemeine Eigenschaften von Glucuronolacton	56
5.1.1	Stabilität von Glucuronolacton in wässriger Lösung	56
5.1.2	Veränderung des pH-Wertes durch Zugabe von Glucuronolacton in Lösung oder Medium.	57
5.2	Wirkung von Glucuronolacton auf Rattenhepatozyten	58
5.2.1	Vitalitätstest	58
5.2.2	Kultivierung von Rattenhepatozyten	59
5.2.3	DDF-Zellaufschluss der Hepatozyten	59
5.2.4	„Mini“ 2D-Gele mit pH 3 - 10	60

5.2.5	2D-Gelanalysen der aus den Hepatozyten isolierten Proteine	61
5.2.6	Vergleich der Spotintensitäten	62
5.3	Transwellstudien zum <i>in vitro</i> Transport an der BHS	71
5.3.1	PCR-Analyse von <i>taut</i>	71
5.3.2	Widerstand und Permeabilitätsmessungen	71
5.3.3	Transport von Glucuronolacton über die BHS	72
5.4	Wirkung von Glucuronolacton, Koffein und Taurin auf Schweinehirnendothelzellen	86
5.4.1	Vitalitätstest	86
5.4.2	Kultivierung und Zellaufschluss der BMEC	87
5.4.3	2D-Gelanalysen der BMEC	87
6	DISKUSSION	92
7	LITERATURVERZEICHNIS	105
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	115
	ANHANG	I

1 Zusammenfassung

Lebensmittel, die nicht nur der Ernährung und dem Genuss dienen, sondern darüber hinaus eine für den Körper oder Geist positive oder schützende Funktion haben sollen, erfreuen sich einer immer größeren Beliebtheit. Die Wirkung der „aktiven“ Inhaltsstoffe dieses sogenannten *functional food* auf den Körper sind teilweise nur unzureichend erforscht und so werden ihnen gelegentlich Eigenschaften zugeschrieben, die bisher noch nicht wissenschaftlich bestätigt wurden.

Zu diesen „aktiven“ Inhaltsstoffen gehören auch Koffein, Taurin und Glucuronolacton. Diese drei Substanzen werden *Energy Drinks* zugesetzt, die für sich in Anspruch nehmen, Körper und Geist zu „beflügeln“. Koffein wirkt sich als Adenosinrezeptor-Antagonist im Gehirn positiv auf den „Wach“-Zustand des Körpers aus. Taurin wird eine Rolle bei der Regulation des Ca^{2+} -Haushaltes und als Antioxidant zugeschrieben. Für Glucuronolacton wird, über die Glucuronsäure, ebenfalls eine antioxidative und entgiftungsfördernde Wirkung angenommen. Das sehr komplexe Gehirn muss neben dem Wach-Schlafzustand eine Vielzahl anderer kognitiver Funktionen erfüllen und steuern. Zu seinem Schutz und zur Vermeidung von Funktionsstörungen, ist der Stoffaustausch zwischen dem Gehirn und dem restlichen Körper durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) stark kontrolliert und reguliert. Stoffe, die im Gehirn wirken sollen, müssen zunächst in der Lage sein, das Hirnkapillarendothel und damit die BHS zu passieren. Daher können durch diese Substanzen ausgelöste funktionelle Veränderungen in der Barriere auch indirekt Funktionen des ganzen Gehirns betreffen.

Aufgrund der dem Glucuronolacton zugeschriebenen entgiftungsfördernden Wirkung wurde seine Wirkung auf Hepatozyten, die als Leberzellen das Hauptentgiftungsorgan des Körpers repräsentieren, untersucht. Dies geschah auf Proteinebene mittels zweidimensionaler Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE). Differentielle Proteinspots wurden aus den Gelen isoliert und mit Hilfe von MALDI-TOF-Analysen und anschließenden Datenbankrecherchen identifiziert. Auf diese Weise konnten 23 unterschiedliche Proteinspots charakterisiert werden, von denen sechs Proteine an Entgiftungsprozessen beteiligt waren. Die Funktionen der Hepatozyten bei der Entgiftung des Körpers werden im Gehirn zum Teil von den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke wahrgenommen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob Glucuronolacton auch zu einer Modifikation in der Proteinexpression der Endothelzellen führt. Zusätzlich wurde die Wirkung der beiden anderen „aktiven“ Inhaltsstoffe der *Energy Drinks*, Koffein und Taurin, auf die Expression der Endothelzellproteine charakterisiert. Hierzu wurden Zellkulturen von Kapillarendothel (BMEC), das zuvor aus Schweinhirnen isoliert wurde, verwendet. Die Endothelzellen wurden mit je einer der drei Substanzen Koffein, Taurin oder Glucuronolacton inkubiert. Anschließend wurden 2D-Gele angefertigt und die Proteinmuster jeweils mit der

Kontrolle verglichen. Durchschnittlich konnten auf diese Weise pro Substanz je 35 unterschiedliche Proteinspots detektiert werden.

Neben Experimenten zu Veränderungen der Proteinexpression wurden auch Transportstudien in einem *in vitro* Modell der Blut-Hirn-Schranke durchgeführt. Der Kern des BHS-Modells bestand aus einer Cokultur von BMEC und Astrocyten. Koffein kann als lipophiles Molekül die BHS nahezu ungehindert passieren. Für Taurin ist ein Transporter an der BHS beschrieben (Kang et al., 2002), der in dieser Arbeit durch PCR auch in frisch isolierten BMEC nachgewiesen werden konnte. In den Transportstudien und der anschließenden Analyse der Proben mittels HPLC-Chromatographie konnte erstmals gezeigt werden, dass Glucuronolacton *in vitro* die BHS passieren kann. Die Transportrate des Glucuronolactons lag im BHS-Modell in derselben Größenordnung wie die der Glucose. Erste experimentelle Daten deuten darauf hin, dass das Glucuronolacton möglicherweise dasselbe Transportsystem benutzt wie die Glucose. Dies konnte aber nicht endgültig geklärt werden.

2 Einleitung

2.1 Die Blut-Hirn-Schranke

Über die Kapillaren des Blutkreislaufsystems findet der Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe statt. Die Konzentrationen der im Blut transportierten Stoffe wie Hormone, Aminosäuren, Nährstoffe, Ionen, Atemgase und Stoffwechselprodukte können im Tagesverlauf (z. B. nach Mahlzeiten) deutliche Schwankungen aufweisen. Für die meisten Gewebe stellt dies kein Problem dar, das Gehirn hingegen reagiert sehr empfindlich auf homöostatische Schwankungen. Einige Hormone und Aminosäuren fungieren auch als Neurotransmitter und sind so neben bestimmten Ionen an der Kommunikation zwischen den Neuronen beteiligt. Damit unter anderem diese Kommunikation nicht gestört wird, ist ein stabiles Milieu für das Gehirn essentiell. Gleichzeitig muss aber die Nährstoffversorgung und die Entsorgung toxischer Substanzen gewährleistet sein. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, ist ein streng kontrollierter Stoffaustausch zwischen Gehirn und Blut notwendig. Die physiologische Barriere, die diese Funktion übernimmt, wird als Blut-Hirn-Schranke (BHS) bezeichnet.

2.1.1 Aufbau der Blut-Hirn-Schranke

Die anatomische Grundlage der BHS ist das einschichtige Endothel der Hirnkapillaren, das sich von anderen Endothelzellen in einigen morphologischen und biochemischen Eigenschaften unterscheidet. Die spindelförmigen Zellen sind durch kontinuierliche, feste Zell-Zell-Kontakte (*tight junctions*) miteinander verbunden, welche die parazelluläre Diffusion hydrophiler Substanzen fast vollständig unterbinden. Durch die *tight junctions* entsteht der für die Hirnkapillaren spezifische hohe elektrische Widerstand von bis zu $2000 \Omega\text{cm}^2$ (Crone und Oelsen, 1982). Aortenendothelzellen zeigen vergleichsweise einen elektrischen Widerstand von nur $13,6 \Omega\text{cm}^2$ (Shasby und Shasby, 1986). Als spezifischer molekularer Bestandteil der *tight junctions* wurde unter anderem das integrale Transmembranprotein Occludin identifiziert (Furuse et al., 1993). Über die intrazellulären Proteine ZO-1 und ZO-2 ist Occludin mit dem Membranbereich der *tight junctions* verankert (Stevenson et al., 1986; Schulze et al., 1997; Mitic und Anderson, 1998). ZO-1 wird häufig als spezifischer Marker für *tight junctions* und zur Charakterisierung von Hirnendothelzellen verwendet.

Eine weitere Besonderheit cerebraler Endothelzellen ist die kleine Zahl pinocytotischer Vesikel, welche die Transcytose stark einschränken. Hingegen deutet die Vielzahl an Mitochondrien auf viele energieverbrauchende Transportmechanismen hin.

Auf der Gefäßaußenseite (abluminal) werden die Hirnendothelzellen von Pericyten bedeckt (s. Abb. 1). Pericyten befinden sich in unterschiedlicher Anzahl auf den Kapillaren fast aller Organe. Die Zahl der Pericyten steht im Zusammenhang mit der Dichte des entsprechenden Gefäßes. Die cerebralen Endothelzellen weisen mit 20-30% einen sehr hohen Bedeckungsgrad auf. Die Pericyten sind in die Basallamina, welche die Endothelzellen umgibt, eingelagert. Sie stehen mit diesen über *gap junctions* in Kontakt, die einen Stoffaustausch von kleinen Molekülen und Ionen ermöglichen. Beide Zelltypen scheinen sich in ihrer Proliferation und Differenzierung gegenseitig zu beeinflussen (Shepro and Morel, 1993). Die Pericyten der cerebralen Kapillaren unterscheiden sich in wesentlichen Merkmalen von anderen Pericyten. So weisen sie weniger kontraktile Proteine auf, besitzen dafür aber Enzyme wie γ -Glutamyl-Transpeptidase und Aminopeptidase N, die bioaktive Peptide abbauen kann (Frey et al., 1991; Risau et al., 1992; Kunz et al., 1994). Da sie außerdem Proteine aus dem Interstitium des Gehirns aufnehmen können, wird ihnen auch die Rolle einer zweiten Abwehrlinie (*second line of defense*) zugeschrieben wird (Nehls und Drenckhahn, 1993; Krause et al., 1993).

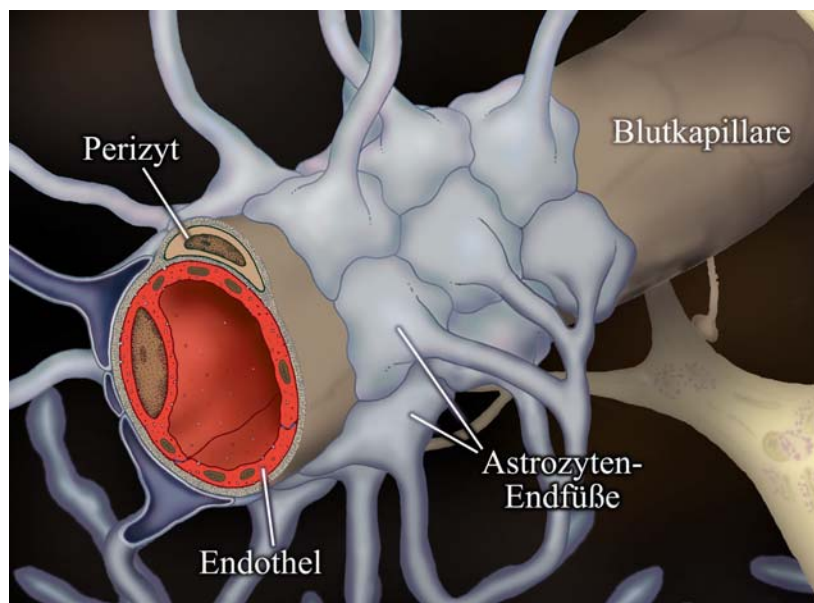


Abb. 1. Schematischer Aufbau einer Hirnkapillare. Quelle: Dermietzel et al., 2002

Die Hirnkapillaroberfläche wird zudem fast vollständig von Astrozytenendfüßchen bedeckt (s. Abb. 1), die jedoch nicht als Permeabilitätsbarriere bzw. Schranke fungieren. Astrocyten gehören zu den Gliazellen und üben im Gehirn unter anderem eine Stützfunktion aus. Sie induzieren aber auch BHS-Eigenschaften an den Hirnkapillaren, wodurch sie essentiell an der Bildung und Erhaltung der Schrankenfunktion beteiligt sind. Mit Hilfe von *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass mit Astrocyten in Cokultur oder mit Astrocyten-konditioniertem Medium Marker für BHS-Eigenschaften in Endothelzellen induziert werden

konnten (Dehouck et al., 1990). Da die Induktion dieser Eigenschaften schon durch Astrocyten-konditioniertes Medium erreicht wurde, liegt die Vermutung nahe, dass die Astrocyten über lösliche Substanzen ihren Einfluss auf die Hirnkapillaren ausüben (Arthur et al., 1987; Rubin et al., 1991). Mit Astrocyten in Cokultur konnten *in vitro* auch die charakteristischen hohen elektrische Widerstände der Endothelzellen erreicht werden (Gaillard et al., 2001).

2.1.2 Transportprozesse an der Blut-Hirn-Schranke

Einerseits sorgt die BHS für ein stabiles Milieu im Gehirn, andererseits muss aber auch die Versorgung des metabolisch sehr aktiven Gehirns mit Nährstoffen wie Glucose, Ketonkörpern, Aminosäuren, Purinen und Cholin sicher gestellt werden. Eine weitere wichtige Aufgabe ist die Entsorgung toxischer Substanzen. Beide Funktionen werden durch verschiedene Transportsysteme erfüllt.

2.1.2.1 Nährstofftransportsysteme

Während lipophile Substanzen, sofern sie nicht an Serumproteine gebunden sind, frei durch die Membran der BHS-Endothelzellen diffundieren können, wird der freie Austausch hydrophiler Substanzen zwischen Gehirn und Blut verhindert. Diese müssen durch spezialisierte Carrier oder durch Transcytose aufgenommen werden. In der BHS konnten zahlreiche Transportsysteme für die Nährstoffversorgung oder die Entgiftung nachgewiesen werden (Aigner et al., 1997). Die Zellmembranen der Hirnkapillarendothelzellen unterscheiden sich in der Verteilung ihrer Transportsysteme (Betz und Goldstein, 1970). So besitzt die luminale Seite z. B. einen niedrigeren Anteil des Hexosetransporters GLUT-1 als die dem Interstitium zugewandte, abluminale Seite (Farrel und Pardridge, 1991). Die Carrier-Systeme lassen sich zunächst in aktive und passive Transporter unterteilen. An der BHS wird der energieabhängige aktive Transport hauptsächlich zum Aufbau eines Natriumgradienten verwendet. Durch die Aktivität einer $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ wird hierbei eine hohe interstitielle Na^+ -Konzentration erreicht. Der Na^+ -Gradient dient wiederum dem Co-Transport von beispielsweise Glycin aus dem Interstitium in die Endothelzelle.

Die Transporter GLUT-1 und GLUT-5 sind Beispiele für die energieunabhängige erleichterte Diffusion entlang eines Konzentrationsgefälles (passiver Transport). Vor allem der GLUT-1 Transporter stellt in Kombination mit den Enzymen Hexokinase und Glucose-6-Phosphatase eine kontinuierliche Versorgung des Gehirns mit Glucose auch bei niedrigem Glucosespiegel im Blut sicher (McAlister et al., 2001). Er kommt in sehr hoher Dichte in den Endothelzellen der Hirnkapillaren vor und ist insulinunabhängig. Wie wichtig die Versorgung des Gehirns mit Glucose, dem Hauptenergielieferant (> 98 %) ist, wird auch durch die hohe Kapazität des

GLUT-1-Transporters deutlich. Im Vergleich zu anderen Nährstofftransportern wie z. B. den Transportern für Monocarbonsäuren oder neutrale Aminosäuren ist die Kapazität des GLUT-1-Transporters um mehr als Faktor 10 größer (Pardridge, 1983). Monocarbonsäuren, wie Milchsäure, Ketonkörper oder Salicylsäure werden, zumindest in Ratten, durch den Transporter MCT-1 hauptsächlich von luminal nach abluminal transportiert. Dieser Prozess ist energieabhängig und wird durch einen Protonengradienten angetrieben (Tamai und Tsuji, 2000). Aminosäuren werden über verschiedene Transporter mit teilweise überlappenden Substratspezifitäten über die BHS transportiert. Aminosäuretransporter lassen sich unterteilen in Na^+ -abhängige (X^- , B^{0+} , A, ASC) oder Na^+ -unabhängige Systeme (Y^+ , L). Ein weiteres Kriterium zur Unterscheidung der Transporter ist ihre Substratspezifität für anionische, kationische oder neutrale Aminosäuren. Das L-System transportiert durch erleichterte Diffusion neben großen, neutralen Aminosäuren wie Leucin und Tyrosin auch größere Moleküle wie z. B. L-Dopa. Tryptophan und Phenylalanin, beides Vorstufen in der Synthese von Neurotransmittern, werden ebenfalls über das L-System in das Gehirn befördert (Sanchez del Pino et al., 1995). Kleine neutrale Aminosäuren wie Alanin und Glycin, die im Gehirn synthetisiert werden, gelangen über das A-System vom Gehirn in die Endothelzellen. Im Gegensatz zu dem L-System, das in beiden Membranen lokalisiert ist, wurde das A-System nur in der abluminalen Membran gefunden (Sanchez del Pino et al., 1995). Die kationischen Aminosäuren (Lysin, Arginin und Ornithin) werden über das Y^+ -System, die anionischen Aminosäuren Aspartat und Glutamat über das X^- -System und β -Aminosäuren wie β -Alanin über das System- β transportiert (Christensen, 1990; Smith und Stoll, 1988; Tamai und Tsuji, 2000). Für die β -Aminosäure Taurin wurde ein Na^+ - und Cl^- -abhängiger Transport in Rattenhirnkapillaren nachgewiesen (Tamai et al., 1995). Die Regulation des Taurin-Transporters (TAUT) findet auf Transkriptionsebene statt. Die Menge der gebildeten mRNA wurde durch Anwesenheit von Taurin vermindert, während der *tumor necrosis factor-alpha* (TNF-alpha) und die hypertonische Behandlung der Zellen zu einem Anstieg der mRNA Menge führten. Es ist jedoch auch eine posttranslationale Regulation der TAUT-Aktivität beschrieben. Durch die Aktivität der Protein Kinase C (PKC) wird die Aktivität des Transporters vermindert (Kang et al., 2002). Für einige Peptide wie z. B. Glutathion gibt es ebenfalls Transportproteine, während andere Peptide und Plasmaproteine über rezeptor-vermittelte Transcytose in das Gehirn gelangen. Über Transcytose wurde bei *in vitro* Experimenten auch Insulin über die BHS transportiert (Miller et al., 1994). Nucleosid-transporteraktivität an der BHS wurde mehrfach bestätigt, wobei die Permeabilität für Purine höher ist als die für Pyrimidine (Tamai und Tsuji, 2000).

2.1.2.2 Efflux-Transporter

Neben dem Transport der Nährstoffe in das Gehirn müssen auch toxische Substanzen aus dem Nervengewebe über die BHS in das Blut ausgeschieden werden. Die hierfür zuständigen sogenannten Efflux-Transporter gehören in der Regel zur Superfamilie der ABC-Transporter (*ATP-binding cassette*). Sie sind wie der Name schon vermuten lässt ATP- und damit energieabhängig. Sie bevorzugen meist hydrophobe Substrate, da diese die BHS leicht überqueren und sich so vermehrt ansammeln können. Allerdings schließt die Substratspezifität einzelner Transporter auch Metall-Ionen, Anionen, Peptide und Zucker ein (Dean et al., 2001). Die Entgiftungsfunktion dieser Transportsysteme durch die Sekretion von Xenobiotika, zu denen unter anderem auch viele Medikamente gehören, hat zu ihrer Bezeichnung als *Multidrug Resistance* Proteine geführt. Um Medikamente gezielt in das Gehirn zu bringen, sind für die Arzneimittelforschung diese Transporter und ihre biochemischen Eigenschaften von enormer Bedeutung. Der bekannteste Vertreter der Efflux-Transporter ist das P-Glykoprotein (oft auch als *Multi-Drug-Resistance-Protein* bezeichnet), das im Menschen von den Genen MDR1 und MDR3 codiert wird (Callen et al., 1987; Chin et al., 1989). Es ist an der Entsorgung von hydrophoben Toxinen aus dem Gehirn beteiligt (Greenwood, 1992). Zu seinen Substraten gehören unter anderem Moleküle mit hydrophoben Regionen, vor allem planare aromatische Domänen, aber auch tertiäre Aminogruppen (Seelig und Landwojtowicz, 2000). Weitere Substrate sind z. B. Antibiotika wie Erythromycin und Tetracyclin (Silverman, 1999). Zusätzlich zu seiner Aufgabe bei der Entgiftung wird vermutet, dass P-Glykoprotein an der Sekretion von im Gehirn oder im Endothel synthetisierten Molekülen beteiligt ist. Es wurde auch in spezialisierten Mikrodomänen der Plasmamembran beschrieben, den sogenannten Caveolae. Hier könnte es an der Transcytose von Makromolekülen und beim Lipidtransport von Bedeutung sein (Demeule et al., 2002). Neben dem P-Glykoprotein (MDR) sind mittlerweile noch eine Reihe anderer Efflux-Transporter beschrieben, die zur Gruppe der ABC-Transporter gehören. Aus der MRP-Familie (*Multidrug Resistance-associated Protein*) wurden MRP1 und MRP3 neben anderen Geweben auch in der BHS charakterisiert. Sie können hydrophobe, ungeladene und anionische, hydrophile Moleküle als Substrat verwenden (Bodó et al., 2003). Das in den Kapillarendothelzellen aus dem Schweinehirn identifizierte *Brain Multidrug Resistance Protein* (BMDP) weist hohe Ähnlichkeit zu dem *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP) des Menschen auf. Die mRNA, die für das BMDP kodiert, liegt in höherer Kopienzahl vor als die, die für das P-Glykoprotein kodiert. Daher wird vermutet, dass das BMDP bei der Entsorgung von Xenobiotika im Schwein eine wichtige Funktion hat (Eisenblätter et al., 2003).

2.1.3 Stoffwechsel an der Blut-Hirn-Schranke

Zum Schutz des Gehirns vor toxischen Substanzen existiert neben dem transporter-vermittelten Efflux solcher Stoffe auch eine enzymatische Barriere. Vor allem lipophile Substanzen, die ungehindert in die Endothelzellen gelangen und nicht sofort wieder heraus transportiert werden können, dienen diesen Enzymen als Substrat. Die Entsorgung erfolgt über die Biotransformation der Substrate. Der Vorgang der Biotransformation wird in drei Abschnitte unterteilt.

- I. Funktionalisierung: In diesem Schritt wird das Substrat durch Oxidierung, Reduzierung, Aromatisierung oder Einführung einer funktionellen Gruppe (z. B. Dealkylierung oder Hydrolyse) für den 2. Schritt der Biotransformation vorbereitet.
- II. Konjugation: Die Verknüpfung des Substrates mit einer polaren Substanz (z. B. Aminosäure, Glutathion oder Glucuronsäure) erhöht dessen Hydrophilie und vermindert eventuell auch die toxische Wirkung.
- III. Elimination: Das hydrophile Substrat wird durch Transporter in den Blutkreislauf überführt und schließlich über Niere oder Darm ausgeschieden.

Durch Modifizierung und Erhöhung des hydrophilen Charakters können auch Xenobiotika, die in die BHS eindringen, unschädlich gemacht werden, bevor sie das Gehirn erreichen. Die an der Biotransformation beteiligten Enzyme sind meist Mitglieder der Cytochrom-P450-Familie. Einige wie z. B. die Glutathion-S-Transferasen weisen zudem gehirnspezifische Isoformen auf (Theodore et al., 1985). Die an der Entgiftung beteiligten P450-Enzyme lassen sich durch eine Vielzahl exogener Substanzen und endogener Faktoren induzieren (Park et al., 1996; Guengerich, 1995). Die meisten an der Biotransformation beteiligten Enzyme sind in mikrosomalen Systemen wie dem glatten endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Oberdisse, 2002).

2.1.4 Hirnkapillarunabhängige Systeme mit Schrankenfunktionen

Es gibt kleine Bereiche, in denen die Hirnkapillaren fenestriert, d. h. durchlässig sind und keine Schrankenfunktion ausüben. Diese Region wird wegen ihrer Lage nahe der Ventrikel als Zirkumventrikelorgan bezeichnet. Hierzu zählen unter anderem die Hypophyse und der Hypothalamus. Damit diese Hirnregionen auf Hormone im Blut reagieren oder selber Hormone ins Blut abgeben können, muss ein direkter Kontakt zwischen Neuronen und Blut

möglich sein. Zum Schutz des Ventrikelliquor und des umgebenden Nervengewebes wird hier die Schrankenfunktion von spezialisierten Ependymzellen übernommen. Sie bilden die Blut-Liquor-Schranke zusammen mit dem Epithel des liquor-produzierenden *Plexus choroidei*. Die Epithelzellen sind wie die Hirnkapillarendothelzellen über *tight junction* verbunden.

Die Spinnwebhaut (*Arachnoidea mater*) ist ein Membransystem aus 10 - 15 Zellschichten, die ebenfalls durch Ausbildung von *tight junctions* die Diffusion von hydrophilen Substanzen verhindert (Brightman und Tao-Cheng, 1993; Nabeshima, 1975). Sie schirmt den mit Cerebrospinalflüssigkeit gefüllten Subarachnoidalraum zwischen Spinnwebhaut und weicher Hirnhaut nach außen ab (Perez-Gomez et al., 1976).

2.2 „Functional Food“

Generell erwartet man von der Nahrung, dass sie den Bedarf des Körpers an essentiellen Nährstoffen deckt. Dies ist auch bei einer vollwertigen Ernährung gewährleistet. Doch selbst in Zeiten der Überversorgung und unzähliger Lebensmittelangebote kommt es immer wieder vor, dass Mangelzustände an einigen Nährstoffen auftreten. Kann oder will man seine Essgewohnheiten nicht umstellen, gibt es die Möglichkeit diese Mangelzustände durch Nahrungsergänzungsmittel zu beseitigen. Diese dienen ausschließlich der Ernährung und werden deshalb als Lebensmittel definiert, auch wenn sie meist in arzneitypischer Form von Brausetabletten oder Kapseln angeboten werden.

Bei *Functional Food* oder zu deutsch funktionellen Lebensmitteln fällt hingegen eine eindeutige Klassifizierung deutlich schwerer. Diese Produkte sollen neben ihrer Funktion als Lebensmittel durch bestimmte, natürliche oder zugesetzte Inhaltsstoffe zusätzliche, schützende oder leistungssteigernde Funktionen übernehmen. Dabei sind die speziellen „Wirkstoffe“ fast so umfangreich wie die Produktpalette. Substanzen, die der Behandlung oder der Vorbeugung von Krankheiten dienen, sind jedoch per Definition Arzneimittel. Die funktionellen Lebensmittel befinden sich also in einer Grauzone zwischen Lebens- und Arzneimittel. In Deutschland gehören sie rechtlich zur Gruppe der Lebensmittel und fallen damit unter das Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-Gesetz (LMBG).

Zur Gruppe der funktionellen Lebensmittel gehört das sogenannte „*Brain Food*“, das nicht nur als Lebensmittel dient, sondern auch eine positive Wirkung auf kognitive Leistungen ausüben soll. Der wissenschaftliche Nachweis von positiven Effekten auf Parameter wie Leistungsfähigkeit oder Wohlbefinden gestaltet sich in der Regel jedoch schwierig und ist nur mit großem Aufwand zu erfassen (Weimer, 2002; Rechhammer, 2001). Ein bekanntes Beispiel für *Brain Food* ist die Produktgruppe der „*Energy Drinks*“. Sie beansprucht sowohl

die Verbesserung kognitiver Funktionen als auch die Steigerung physiologischer Eigenschaften, wie Entgiftung und Schutz vor Oxidanzien. Die speziellen „Wirkstoffe“ neben Saccharose, Glucose und einigen Vitaminen sind vor allem Koffein, Taurin und Glucuronolacton.

2.2.1 Koffein

Kaffee ist das Volksgetränk Nummer eins in Deutschland. Die wohl bekannteste Komponente des Getränks ist das Koffein (s. Abb. 2). Wie das Theophyllin (Tee) und das Theobromin (Tee, Kakao) gehört auch das Koffein zur Gruppe der Methylxanthine aus der Stoffklasse der Alkaloide. Natürlich kommt das Koffein im Kaffee, Tee oder Kakao, als Zusatzstoff in Cola und verschiedenen *Energy Drinks* vor. Dabei gibt es jedoch deutliche Unterschiede im jeweiligen Koffeingehalt (s. Tab. 1).

Tab. 1 Koffeingehalt in verschiedenen Lebensmitteln (<http://www.quarks.de/kaffee/00.htm>).

Lebensmittel	Durchschnitt [mg]	Streubereich	Durchschnitt [mg/l]
Kaffee (je Tasse á 150 ml)	100	50 - 150	667
Tee (je Tasse á 150 ml)	50	25 - 90	333
Kakao (je Tasse á 150 ml)	5	2 - 20	33
Halbbitterschokolade (100 g)	90	50 - 110	900*
Vollmilchschokolade (100 g)	15	3 - 35	150*
Cola (333 ml)	40	35 - 55	120
Energy Drinks (z. B. Red Bull, 250 ml)	80	320	320

* = [mg/kg]

Koffein wird sehr schnell resorbiert (99% in 45 min) und gleichmäßig in alle Gewebe verteilt (Bonati et al., 1982). Aufgrund seines lipophilen Charakters kann es sowohl die Blut-Hirn-Schranke als auch die Placenta-Schranke ungehindert passieren. Gut ein Drittel des Koffeins wird von Proteinen des Blutplasmas gebunden und bleibt somit inaktiv. Abgebaut wird es in der Leber mittels Biotransformation durch das mikrosomale Cytochrom P450. Die primären Abbauprodukte, Paraxanthin, Theophyllin und Theobromin entstehen durch Demethylierung (s. Abb. 2). Der Hauptmetabolit ist das Paraxanthin, das auch koffeinähnliche Wirkung hat. Ein Teil der Koffeinwirkung ist somit auf einen Metaboliten des Koffeins zurückzuführen (Germershaus und Imming, 2001). Die Halbwertszeit von Koffein beträgt ca. vier Stunden, dabei wird die Abbaugeschwindigkeit jedoch durch die Aktivität der entsprechenden Enzyme, die von Mensch zu Mensch variieren sowie verschiedenen Umwelteinflüssen bestimmt. Raucher z. B. scheiden Koffein schneller aus, da die polycyclischen Kohlenwasserstoffe aus dem Zigarettenrauch die Aktivität der abbauenden Enzyme erhöhen.

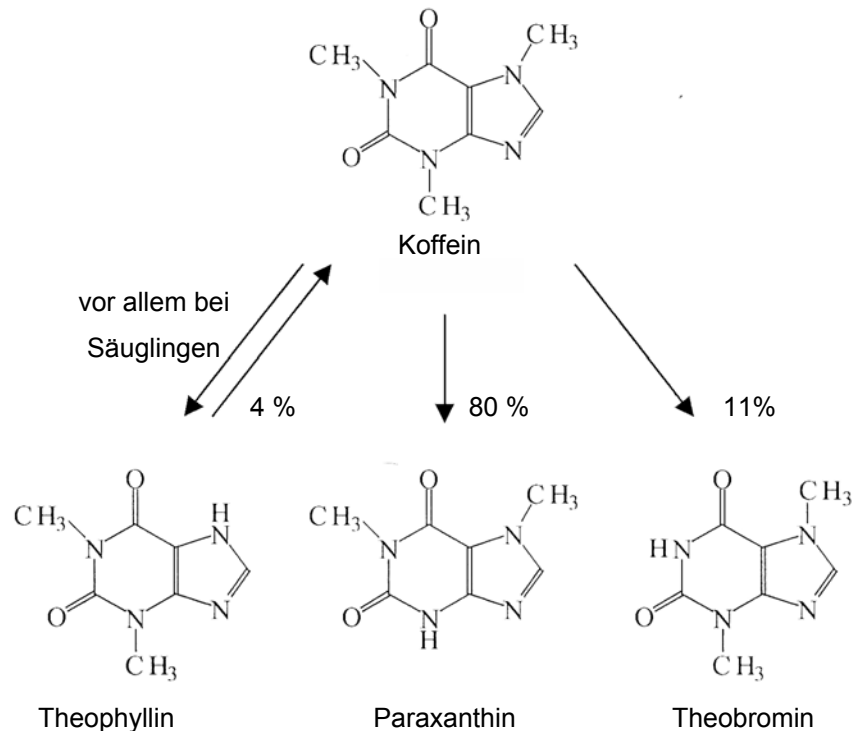


Abb. 2. Koffein und seine Primärmetabolite

Die Wirkung des Koffeins beruht auf seiner Fähigkeit an Adenosinrezeptoren zu binden und hier als Antagonist kompetitiv die Bindestellen des natürlichen Bindungspartners Adenosin, zu blockieren. Es gibt verschieden Subtypen von Adenosinrezeptoren (A_1 , A_{2A} , A_{2B} und A_3), von denen bei physiologischen Konzentrationen von Koffein oder anderen Methylxanthinen vor allem die Rezeptoren A_1 und A_{2A} betroffen sind (Loeffler, 2000). Die Adenosinrezeptoren interagieren über stimulierende (A_{2A}) bzw. inhibierende (A_1) G-Proteine mit einer Adenylatcyclase (s. Abb. 3). Die Aktivierung des Rezeptor A_1 inhibiert das Enzym, während die Aktivierung des Rezeptors A_{2A} die Adenylatcyclase aktiviert. Diese synthetisiert wiederum den sekundären Botenstoff cAMP, der seinerseits zellspezifische Kinasen aktiviert. Die Proteinkinasen phosphorylieren daraufhin Zelltyp-abhängig verschiedene Proteine. Die Signalkaskade kann durch Phosphodiesterasen unterbrochen werden, die cAMP in nicht-cyclisches-AMP umwandeln. Die Fähigkeit einiger Methylxanthine die Phosphodiesterase zu hemmen, dürfte *in vivo* mit Koffein nicht auftreten, da die hierzu nötige Konzentration von 0,1 - 1 mM durch orale Aufnahme im allgemeinen nicht erreicht werden kann. Zwar kann Theophyllin schon ab einer Konzentration von 50 μ M zu einer verminderten Aktivität der Phosphodiesterasen führen, doch erfolgt die physiologische Wirkung der Methylxanthine wohl eher über ihre Fähigkeit an die oben genannten Adenosinrezeptoren zu binden (Loeffler, 2000). Wird mehr Energie in den Nervenzellen in Form von ATP verbraucht, als ATP zur Verfügung steht, sammelt sich dessen Abbauprodukt Adenosin an.

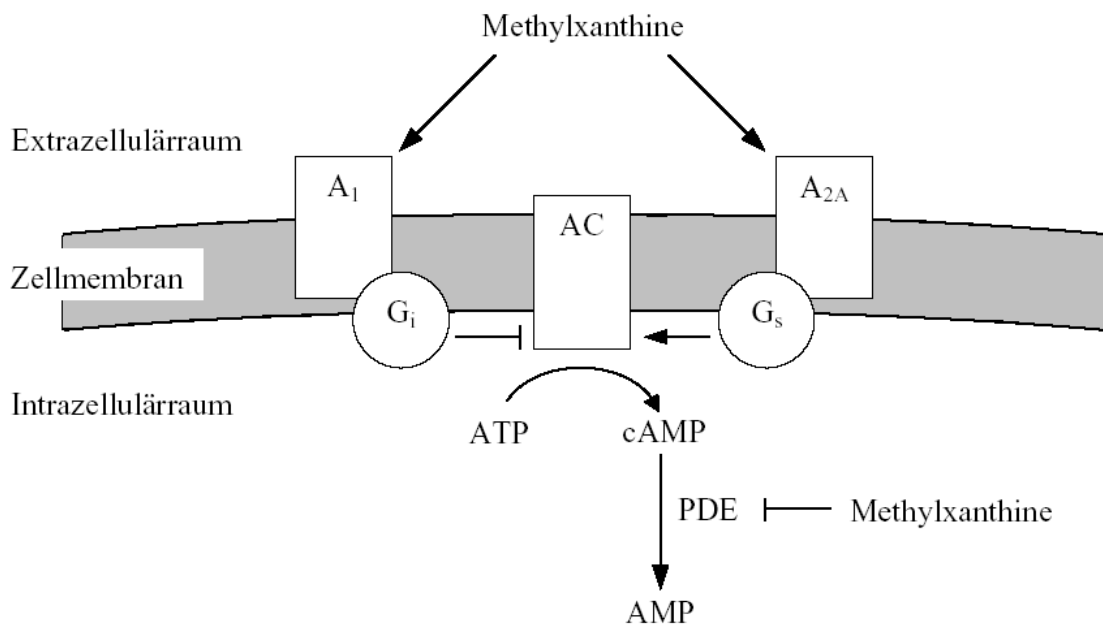


Abb. 3. Signalübertragung durch Adenosinrezeptoren (A₁ und A_{2A}). AC = Adenylatcyclase, G = G-Protein, PDE = Phosphodiesterase

Ab einer bestimmten Konzentration kann das intrazelluläre Adenosin über einen Nukleosidtransporter in das Interstitium ausgeschieden werden. Dort bindet und aktiviert es die Adenosinrezeptoren des Typs A₁ und hemmt über die folgende Signalkaskade die Freisetzung von bestimmten Neurotransmittern (wie z. B. Glutamat), die in den Synapsen für die chemische Weiterleitung eines Nervenreizes zuständig sind. Dies führt zu einer Veränderung in den Wach- und Schlafzentren zu Gunsten des Schlafzustandes (Sicard, 2003). Durch die kompetitive Bindung des Koffeins an den Adenosinrezeptor bleibt das System auf „Wach“ eingestellt und die Müdigkeit wird unterbunden, Aufmerksamkeit und Konzentrationsfähigkeit werden erhöht. Aufgrund der unterschiedlichen Adenosinrezeptoren zeigt Koffein im Körper unterschiedliche Wirkung. Es steigert die Leistungsfähigkeit (Kontraktionskraft) der Skelettmuskulatur. Dies geschieht durch eine vermehrte Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Reticulum bei gleichzeitig veränderter Rückspeicherung. Auf das Herzkreislaufsystem hat das Koffein ähnliche Wirkung. Durch stärkere Kontraktion des Herzmuskels steigt der Blutdruck, was einen erhöhten Filtrationsdurchsatz der Niere und dadurch einen gesteigerten Harndrang zur Folge hat (diuretische Wirkung). Nach Armstrong (2002) ist die leichte diuretische Wirkung mit der von Wasser vergleichbar und führt selbst bei sportlich aktiven Menschen nicht zu einem Ungleichgewicht in der Elektrolyt-Bilanz. Die Stimulierung der Blutgefäße und damit der Durchblutung ist ebenfalls unterschiedlich. Während es zu einer Abnahme in cerebralen Gefäßen kommt, nimmt die Durchblutung in den peripheren Gefäßen zu. Außerdem dehnen

sich die Muskeln in den Wänden der Bronchialgefäße und erleichtern so den Atemvorgang. Auch der Fettstoffwechsel wird durch Koffein angeregt, indem das synthetisierte cAMP die Lipasen stimuliert. Nach einer Veröffentlichung von van Dam und Feskens (2002) verringert der Konsum von mehr als sieben Tassen Kaffee am Tag das Risiko, an Diabetes des Typs 2 (Altersdiabetes) zu erkranken um 50 %. Mit steigender Dosis können aber auch negative Effekte wie Ruhelosigkeit, Übelkeit und Schlafstörungen auftreten. Bei regelmäßigem Koffeinkonsum tritt zusätzlich ein Gewöhnungseffekt auf, d. h. mit der Zeit wirkt die gleiche Menge Koffein weniger anregend. Diese Anpassung des Körpers erklärt sich durch vermehrte Bildung von Adenosinrezeptoren.

Koffein verursacht eine geringe Abhängigkeit, die sich bei Entzug durch Kopfschmerzen und Depressionen bemerkbar machen kann. Diese Entzugerscheinungen klingen allerdings bereits nach wenigen Tagen wieder ab (Weimer, 2002).

2.2.2 Taurin

Im Körper eines Erwachsenen wird Taurin (2-Aminoethansulfonsäure, s. Abb. 4) als Stoffwechselendprodukt aus Methionin oder Cystein gebildet (50 - 125 mg/Tag).

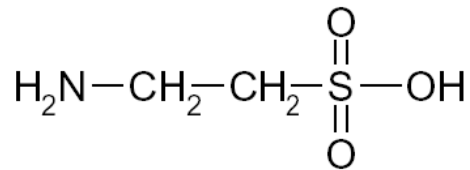


Abb. 4. Strukturformel von Taurin

Cysteinsulfonatdecarboxylase (CSAD) ist das Schlüsselenzym dieser Vitamin B6-

abhängigen Biosynthese, die hauptsächlich in der Leber und im Gehirn stattfindet. Taurin ist nicht proteinogen, d. h. es wird nicht zur Synthese von Proteinen verwendet, da es eine Sulfongruppe und keine Carboxylgruppe besitzt. Taurin wird vor allem aus Meeresfrüchten, Fisch und Fleisch zusätzlich über die Nahrung aufgenommen (ca. 200 mg/Tag). In *Energy Drinks* liegt Taurin in einer Konzentration von 4 g/l vor. Die im Körper gespeicherte Menge liegt zwischen 12 g und 18 g und damit ist Taurin nach Glutamat die zweithäufigste Aminosäure. Organe mit besonders hohem Tauringehalt sind Skelettmuskeln, Herz, Gehirn und Leber. Allein die Biosynthese liefert genug Taurin, um den Bedarf des gesunden, erwachsenen Körpers zu decken. Somit gehört Taurin nicht zu den essentiellen Aminosäuren, die durch die Nahrung aufgenommen werden müssen (Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V., 2001). Säuglinge und Frühgeborene sind jedoch im Gegensatz zum Erwachsenen nicht in der Lage, über die Nieren den Großteil des Taurins aus dem Primärurin zu reabsorbieren. Des Weiteren ist ihre CSAD-Aktivität noch nicht ausreichend entwickelt. Hier kann es bei unzureichender Aufnahme durch die Nahrung zu Mangelerscheinungen kommen. Im Stoffwechsel ist Taurin an der Bildung gepaarter Gallensäuren, wie der Taurocholsäure und damit an der Emulgierung von Nahrungsfetten

zum beschleunigten Fettabbau beteiligt. Die Hauptaufgaben des Taurins werden in der Regulation des Zellvolumens bzw. der Osmoregulation, der Stabilisierung von Membranen, der Veränderung der Ionenpermeabilität und des Calciumeinstroms gesehen (Huxtable, 2000). Für den osmosensitiven Taurinefflux aus angeschwollenen Zellen wird die Aktivität einer Tyrosinkinase verantwortlich gemacht, deren Regulation aber bisher nicht untersucht wurde (Pasantes-Morales und Franco, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Taurin als Antioxidant Gewebe zu schützen vermag (Schuller-Levis und Prak, 2003). Die antioxidative Wirkung ergibt sich aus der Fähigkeit des Taurins, als Hypochlorit-Radikalquencher zu fungieren. Ist der enzymatische Abbau von Wasserstoffperoxid in Zellen unter oxidativem Stress überlastet, kann sich freies Wasserstoffperoxid ansammeln. Als starkes Oxidationsmittel kann Wasserstoffperoxid z. B. Lipide oxidieren oder mit Chlorid-Ionen hypochlorige Säure (HOCl) bilden, die wie Wasserstoffperoxid selbst ein starkes Oxidationsmittel und damit zellschädigend ist. Hypochlorige Säure reagiert mit Taurin zum schwachen, weniger schädlichen Oxidationsmittel N-Monochloro-Taurin, welches wahrscheinlich wiederum durch Glutathion reduziert und somit endgültig unschädlich gemacht wird (Bretz, 2002).

Auf Muskelzellen hat Taurin einen positiven inotropen Effekt, d. h. es wirkt kontraktionssteigernd. Als Ursache hierfür wird die Fähigkeit zur Regulation der Ca^{2+} -Kanäle sowie anderer Ionenkanäle vermutet (Lombardini und Schaffer, 1992; Bretz, 2002). Auch bei der Bildung und dem Erhalt intakter Lichtrezeptoren spielt Taurin eine Rolle. Als Grundlage hierfür wird vor allem seine membranstabilisierende und antioxidative Wirkung angenommen. Bei Katzen führt eine Taurinverarmung in der Retina zur Erblindung (Timothy und Birdsall, 1998). Mehrere Arbeiten deuten darauf hin, dass Taurin im Zentralen Nervensystem eine Funktion als Neuromodulator und/oder als Neurotransmitter mit inhibitorischer Wirkung hat. Taurin induziert Hyperpolarisation und inhibiert das „Feuern“ zentraler Neuronen (Saransaari und Oja, 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Taurin an den Rezeptor der γ -Aminobuttersäure (GABA) binden kann und so die Wirkung des Neurotransmitters GABA beeinflusst (Bretz, 2002; Huxtable, 1992 und 1996). Die genaue Funktion des Taurins konnte in diesem Zusammenhang jedoch bisher nicht geklärt werden. Durch Taurin wird auch ein potenzieller Schutz von Neuronen vermutet. Shuaib (2003) konnte allerdings durch Verabreichung von Taurin in Tierversuchen, zumindest im Krankheitsbild der cerebralen Ischämie, keine signifikante neuroprotektive Wirkung des Taurins nachweisen. Allerdings haben Saransaari und Oja (2000) festgestellt, dass durch Ischämie und andere neuronenschädigende Einflüsse im Hippocampus ein Überschuss an neuronenanregenden Aminosäuren mit einer vermehrten Taurinfreisetzung einhergeht. Sie vermuten, dass die Taurinausschüttung eine Erhöhung des Anregungszustandes auf ein neurotoxisches Niveau verhindert und damit die Neuronen vor einer Schädigung oder sogar dem Absterben schützt.

Der durch Ischämie verursachte Ca^{2+} -Einstrom wird ebenfalls durch Taurin vermindert. Die akute extrazelluläre Taurinfreisetzung erfolgt wahrscheinlich durch die Neuronen selbst, während der Taurinspiegel langfristig über das Taurintransportsystem der BHS reguliert wird. Die natürliche Menge von Taurin im Körper ist dabei völlig ausreichend, um die angesprochenen Funktionen des Taurins im gesunden Menschen zu gewährleisten. Eine Supplementierung scheint bei gesunden Personen daher keine zusätzlichen positiven Effekte hervorzurufen. In einer Studie von Ward et al. von 2001 wurde durch orale Zufuhr von Taurin in Ratten die Aktivität des Enzyms Katalase im Gehirn und in der Leber vermindert. Die Aktivitätsminderung im Gehirn war dabei deutlicher als die in der Leber. In derselben Arbeit wurde auch eine erhöhte Ethanol-Eliminierung aus Gehirn und Leber durch Taurin, bei unveränderter hepatischer Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität beobachtet.

Ein Mangel an Taurin und anderen Nährstoffen wie Carnitin, Coenzym Q10 u. a. ist bei chronischem Herzversagen beschrieben und kann erfolgreich durch entsprechende Nahrungsmittelzusätze behoben werden. Vermutlich steht der Mangel an Taurin in Zusammenhang mit dem gestörten Calciumhaushalt, der bei dieser Krankheit zu beobachten ist (Sole und Jeejeebhoy, 2002). In therapeutischen Anwendungen kann die Supplementierung der Nahrung mit Taurin durchaus positive Wirkungen auf den Patienten haben. Meist geschieht dies durch den Ausgleich von Mangelercheinungen. Bei Patienten mit Bluthochdruck konnte dieser durch Gabe von 6 g Taurin pro Tag über einen Zeitraum von sechs Wochen gesenkt werden. Es gibt jedoch keine Untersuchungen über die Auswirkung einer langfristigen Behandlung mit Taurin (Militante und Lombardini, 2002). Auch die Beschwerden nach einem Herzinfarkt konnten durch Gabe von Taurin neben „herkömmlichen“ Medikamenten gemildert werden (Iwata und Lombardini, 1989). Bei Epileptikern mit einem Defekt in der Blut-Hirn-Schranke zeigt orale Administration von Taurin anti-epileptogenes Potential. Die Rückfallhäufigkeit im Alkoholentzug wurde durch zusätzliche Taurinverabreichung ebenfalls etwas vermindert. Bei Alzheimer-Patienten ist der Spiegel des Neurotransmitters Acetylcholin niedriger als bei gesunden Menschen. In Tierversuchen konnte die Acetylcholinmenge im Gehirn durch Tauringabe erhöht werden. Wie bei den meisten anderen therapeutischen Ansatzmöglichkeiten liegen aber hierzu keine ausreichenden klinischen Studien vor (Timothy und Birdsall, 1998). Die Wirkmechanismen des Taurins und seine Rolle bei den einzelnen Krankheitsbildern sind ebenfalls noch nicht eindeutig geklärt.

Über die Toxizität von Taurin in sehr hohen Dosen gibt es bisher keine Untersuchungen. Allerdings wurde Taurin in Zellkultur bereits mit 30 mM und in klinischen Studien mit 8 g pro Tag und Person über einige Wochen eingesetzt ohne dass schädliche Effekte beobachtet wurden (Corte et al., 2002; Timothy und Birdsall, 1998). In Leukozyten kann die Taurinkonzentration bis zu 50 mM erreichen (Schuller-Levis und Park, 2003).

2.2.3 Glucuronolacton

Glucuronolacton ist die Kurzform für das D-Glucurono- γ -lacton (s. Abb. 5). Es ist leicht

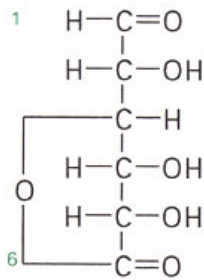


Abb. 5. Strukturformel von Glucuronolacton

wasserlöslich und in Lösung optisch aktiv. Glucuronolacton ist ein natürliches Stoffwechselprodukt des Menschen und wird im Körper durch Oxidation von Uridin-5-diphosphat-D-Glucose (UDP-Glucose) gebildet (s. Abb. 6). Bei physiologischem pH-Wert ist es im Gleichgewicht mit der Glucuronsäure. Diese ist in aktivierter Form als UDP-Glucuronsäure an der Biotransformation von Xenobiotika und körpereigenen Abfallprodukten beteiligt. In Phase II der Biotransformation dient die hydrophile Glucuronsäure als Konjugationspartner

für lipophile Xenobiotika. Die Biotransformation findet hauptsächlich in der Leber statt, kommt aber auch im Gehirn vor (s. 2.1.3). Die aus der Konjugation entstandenen Glucuronide können im Darm durch das bakterielle Enzym β -Glucuronidase wieder hydrolysiert werden. Als Folge werden die Xenobiotika nicht mehr ausgeschieden, sondern vom Körper reabsorbiert. In der Medizin findet das D-Glucarol Anwendung zur Förderung von Entgiftungsreaktionen, da das daraus gebildete D-Glucaro-1,4-lacton die β -Glucuronidase und somit die Reabsorption von glucuronidierten Toxinen hemmt (Walaszek et al., 1997). Das D-Glucaro-1,4-lacton ist aber auch ein Zwischenprodukt sowohl der enzymatischen als auch der radikalischen Oxidation von Glucuronolacton bzw. Glucuronsäure zu Glucarol (Matsui et al., 1969; Marsh, 1986). Durch die radikalische Oxidation wirkt die Glucuronsäure als Antioxidant zum Schutz vor Wasserstoffperoxid oder Hydroxylradikalen. Marsh schlägt als mögliche Funktion der β -Glucuronidase das Bereitstellen von freier Glucuronsäure als Radikalfänger vor.

Die Aktivität der β -Glucuronidase ist bei einigen Krankheiten, wie z. B. Diabetes und verschiedenen Arten von Krebs erhöht, wodurch es zu einem Defizit in der Entsorgung von toxischen Substanzen kommen kann (Merimee, 1981; Oredipe et al., 1987; Severini et al., 1995). Außer durch Oxidation zu Glucarol kann Glucuronolacton auch in Xylitol und L-Xylulose metabolisiert werden (Oka et al., 1976; Scientific Committee on Food, 1999). Allgemein gilt die Menge der Metabolite des Glucuronsäure-Weges (s. Abb. 6) im Urin als Anhaltspunkt für die Aktivität der microsomalen Enzyme in der Leber (Hunter et al., 1971; Lake et al., 1982). Glucuronolacton als Inhaltsstoff macht einen *Energy Drink* laut Hersteller erst „echt“, d. h. es gilt sozusagen als Gütesiegel. Die Konzentration von Glucuronolacton beträgt in diesen Getränken zwischen 2 und 2,4 g/l. Im Vergleich dazu kommt es im Wein, die für den Menschen glucuronolactonreichste Quelle, nur mit 20 mg/l vor (bgvv, 2002).

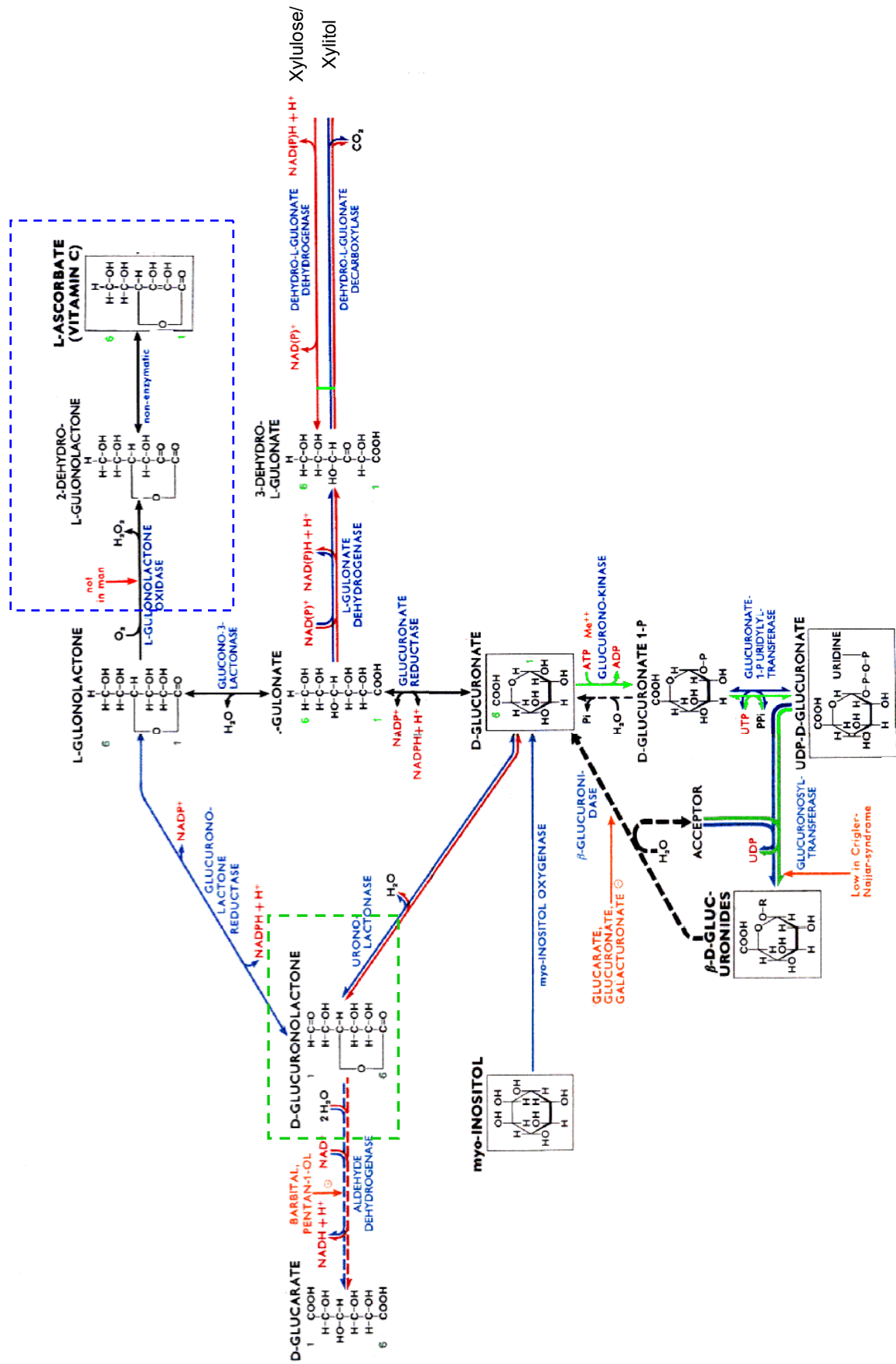


Abb. 6. Stoffwechselwege des Glucuronolactons. Aktivierte Glucuronsäure (UDP-Glucuronsäure) wird auf ein hydrophobes Substrat übertragen. Das dadurch entstandene β -D-Glucuronid kann nun über die Niere oder den Darm ausgeschieden werden. Teilweise wird die Glucuronsäure durch die β -Glucuronidase wieder abgespalten und das Substrat wird im Darm reabsorbiert. Die Glucuronsäure wiederum kann in das Glucuronolacton (grüner Kasten) umgewandelt werden. Glucuronolacton wird zu Glucarat oxidiert, welches über den Urin ausgeschieden wird. Alternativ wird es zu Xylitol oder L-Xylulose metabolisiert. Die Synthese von Vitamin C findet bei vielen Säugern, nicht aber bei Primaten statt (blauer Kasten).

Quelle: Boehringer Mannheim's (Roche) Biochemical Pathways (1993).

In dem *Energy Drink* „Red Bull“ liegt Glucuronolacton nach Herstellerangaben teilweise hydrolysiert als Glucuronsäure vor (Nohl, 1996). Es soll die Entgiftungsreaktionen im Körper beschleunigen und damit die Ermüdung bei körperlicher Betätigung verzögern. In Asien und Frankreich werden glucuronolactonhaltige Produkte (z. B. Guronsan C) als Medikamente zur Erhöhung der Leberfunktionen und/oder gegen Müdigkeit verkauft. Bei diesen Produkten sind neben Glucuronolacton aber meist auch weitere Inhaltsstoffe wie Koffein, Ascorbinsäure und Glucuronoamid enthalten.

Marsh zeigte 1963, dass die zusätzliche Aufnahme von Glucuronolacton zu deutlich vermehrter Ausscheidung von D-Glucarat führt. Fishman et al. (1951) konnte nachweisen, dass die orale Verabreichung von Glucuronolacton nach einer Stunde beim Menschen zu einer um 75 % verminderten Aktivität der β -Glucuronidase im Blut führt. Harigaya (1964) dagegen beobachtete keine Aktivitätsänderung der β -Glucuronidase in Rattenleber nach oraler Gabe von Glucuronolacton. Es gibt eine Untersuchung, die belegt, dass die Ausdauer von Ratten durch die Gabe von Glucuronolacton erhöht wurde (Tamura et al., 1966). Allerdings sind Ratten, wie fast alle Nager, im Gegensatz zu Primaten in der Lage, aus Glucuronolacton über L-Gulonolacton Vitamin C zu synthetisieren (s. Abb. 6). Da ihnen also andere Stoffwechselwege als den Primaten zur Verfügung stehen, sind Versuche mit Ratten und Mäusen in diesem Zusammenhang mit Vorsicht zu beurteilen. Eine Studie zur Toxizität von Glucuronolacton wurde ebenfalls mit Ratten durchgeführt (Scientific Committee on Food, 2003; WIL Research Laboratories, 2001b). Darin wurde sechs Wochen alten Ratten über 13 Wochen Glucuronolacton in verschiedenen Dosen (0, 300, 600 und 1000 mg/kg Körpergewicht pro Tag) durch Trinkwasser verabreicht. Bei weiblichen Ratten traten dosisabhängig Entzündungen an den Nieren auf (ab 600 mg/kg), die bei männlichen Ratten nicht beobachtet wurden. Ansonsten wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Ratten festgestellt. In Experimenten mit Goldhamstern wurden ebenfalls bei der Gabe einer Glucuronolactondosis von 500 mg/kg Körpergewicht pro Tag keine toxischen Effekte oder Veränderungen des Körpergewichtes beobachtet (Di

Filippo und Blumenthal, 1972). Bisher liegen keine Daten vor, dass diese Ergebnisse auf den Menschen, der wie andere Primaten auch nicht die gleichen Stoffwechselwege (s. o.) verwendet, übertragen werden können.

In einer Arbeit von Seidel et al. (2000) wurde die Wirkung von Koffein, Taurin und Glucuronolacton auf das Wohlbefinden, die Konzentrationsfähigkeit und die Reaktionszeit untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass diese Stoffe den Leistungsabfall verhindern bzw. verlangsamen. Jedoch wurden nur alle Stoffe zusammen als Mixtur untersucht. Es ist also durchaus denkbar, dass diese Resultate alleine auf der Wirkung von Koffein beruhen und die anderen Stoffe gar nicht oder nur wenig dazu beitragen. Reyner und Horne postulieren ebenfalls, dass diese drei Substanzen zusammen als „*functional energy drink*“ = FED der Ermüdung beim Autofahren entgegenzuwirken vermochten, wie sie dies auch zuvor für Koffein (Kaffee) alleine nachgewiesen hatten. In beiden Fällen wurde eine Verbesserung der untersuchten Parameter (Fahrsimulator, subjektive Müdigkeit und EEG) in derselben Größenordnung beobachtet, obwohl die Koffeinmenge im FED nur 80 mg im Vergleich zu 200 mg im Kaffee betrug. Daraus schlossen sie, dass der FED durch seine zusätzlichen Komponenten effektiver war als Kaffee.

2.3 Aufgabenstellung und Ziel dieser Arbeit

Der Markt und die Produktpalette des sogenannten *Functional Food* wird immer größer und unübersichtlicher. Die „Wirkstoffe“ dieser Produkte sind teilweise nur unzureichend untersucht und die zu Grunde liegenden Wirkmechanismen noch nicht oder erst ansatzweise verstanden. Von den drei Hauptwirkstoffen der *Energy Drinks* ist Koffein bereits in zahlreichen Studien beschrieben. Taurin ist in letzter Zeit vermehrt Gegenstand wissenschaftlicher Analysen geworden, vor allem die Möglichkeit zum therapeutischen Einsatz steht hierbei im Vordergrund. Taurin weist ein breites Wirkspektrum auf, wobei die molekularen Zusammenhänge oft noch nicht vollständig aufgeklärt sind. In den 50er und 60er Jahren wurde eine Reihe von Untersuchungen über den Metabolismus des Glucuronolactons publiziert. Hierbei wurde ein potenzieller Zusammenhang zwischen dem Glucuronolactonstoffwechsel und den Entgiftungsreaktionen, insbesondere durch Glucuronidierung postuliert. In letzter Zeit wurden die Wirkstoffe auf ihre Fähigkeit untersucht, kognitive Funktionen wie Müdigkeit, Aufmerksamkeit und Konzentrationsfähigkeit zu beeinflussen. In diesen Studien wurde aber in der Regel eine Mixtur der drei Stoffe und nicht jeder Stoff im einzelnen betrachtet.

In dieser Arbeit sollte die Wirkung von Koffein, Taurin und insbesondere von Glucuronolacton auf Hirnkapillarendothelzellen auf Proteinebene analysiert werden. Zusätzlich sollte die entgiftungsfördernde Wirkung des Glucuronolactons auch in Hepatozyten untersucht werden. Beide Zelltypen, Hirnkapillarendothel und Hepatozyten, spielen in den Entgiftungsprozessen des Körpers bzw. des Gehirns eine bedeutende Rolle. Proteine wie z. B. das Cytochrom P450 System, das an Entgiftungsreaktionen beteiligt ist, konnten bereits über eine Reihe von Substanzen induziert werden. Vor den Proteomanalysen war es notwendig, die Toxizität von Glucuronolacton auf Hepatozyten- und Endothelzellkulturen zu untersuchen, um cytotoxische Effekte bei den Analysen zu vermeiden. Die Wirkungsanalyse auf Proteinebene sollte mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese durchgeführt werden. Durch Vorversuche sollte ein geeigneter pH-Bereich ermittelt werden. Im Anschluss daran sollte die differentielle Spotverteilung in den 2D-Gelen charakterisiert werden. Im Falle der Hepatozyten sollten differentielle Spots zusätzlich isoliert und identifiziert werden.

Neben den Wirkstoffanalysen auf Proteinebene sollten Transportstudien in einem *in vitro* Modell der BHS durchgeführt werden. In diesen Transportstudien sollte geklärt werden, ob Glucuronolacton die BHS passieren kann, weshalb auch ein Nachweisverfahren für Glucuronolacton etabliert werden sollte. Der Transport von Taurin mittels des Transporters TAUT wurde für Hirnkapillarendothelzellen aus Ratte beschrieben. Deswegen sollte mittels PCR von cDNA überprüft werden, ob die mRNA von TAUT auch in den Hirnkapillarendothelzellen aus dem Schwein (BMEC), die im BHS-Modell zum Einsatz kamen, exprimiert wurde.

3 Material

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
α -Cyanozimtsäure	Sigma
β -Mercaptoethanol	Roth
ε -Aminocapronsäure	Roth
1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolon	Sigma
Acetonitril <i>p. a.</i>	Roth
Agarose	Sigma
Ameisensäure <i>p. a.</i>	Merck
Ammoniumhydrogencarbonat	Merck
Ammoniumperoxodisulfat	Merck
BCIP	Sigma
Bromphenolblau	Merck
CHAPS	Amersham Pharmacia
Chloroform	Roth
Coomassie Brilliant Blau R 250	Serva
DAPI	Esplora
Dextran	Sigma
Digitonin	Fluka
Dinatriumthiosulfat	Merck
DOC	Sigma
DTT	Merck
EDTA	Roth
Fluoresceindiacetat	Fluka
Formaldehyd	AppliChem
Glucuronolacton	Sigma
Glycerin	Roth
Glycin	AppliChem
Harnstoff	Merck
HPLC-H ₂ O	Roth
Iodacetamid	Amersham Pharmacia
IPGphor-Puffer	Amersham Pharmacia
Natrium-Fluorescein	Sigma
NBT	Sigma

n-Butanol	Roth
n-Octy- β -D-glucopyranosid	Boehringer
PEG 4000	Roth
Percoll	Sigma
PIPES	AppliChem
PMSF	Sigma
Ponceau S	Roth
Propidiumiodid	Sigma
Roti-Block	Roth
Rotiphorese 30	Roth
Roti-Quant	Roth
Saccharose	Roth
SDS	Roth
Silbernitrat	Roth
Silikonöl	Merck
Sypro Ruby™	Genomics Solutions
TEMED	AppliChem
Thioharnstoff	Merck
TLCK	Sigma
Trichloressigsäure	Roth
Triton X-100	Fluka
Tween 20	Roth
Tween 40	Fluka

Allgemeine Laborchemikalien wurden von den Firmen AppliChem, Fluka, Merck, Roth und Sigma bezogen.

Membranen und Filter

Whatman 3 mm Papier	Schleicher&Schuell
Membranfilter (0,45 μ m)	Schleicher&Schuell
Nitrocellulose-Membran (0,2 μ m)	Schleicher&Schuell

Enzyme, Proteine, Substrate und Antikörper

Anti-(GLUT1)-IgG (aus Kaninchen)	Chemicon
Anti-(ZO1)-IgG (aus Ratte)	Chemicon
Anti-(vWF)-IgG (aus Kaninchen)	Sigma
Anti-(Kaninchen-IgG)-IgG (aus Ziege)	
mit Cy3 konjugiert	Jackson ImmunoResearch
Anti-(Ratte-IgG)-IgG (aus Ziege)	
mit Cy3 konjugiert	Jackson ImmunoResearch
Anti-Kaninchen-IgG (aus Ziege)	
mit Alkalischer Phosphatase konjugiert	Sigma
Anti-Maus-IgG (aus Ziege)	
mit Alkalischer Phosphatase konjugiert	PharMingem
Benzoase ($\geq 25 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	Merck
Bovines Serum Albumin	Sigma
cDNA aus verschiedenen Geweben (Schwein)	Esplora
Dispase II	Roche
HotStarTaq DNA Kit	Qiagen
Kollagenase D	Roche
See Blue Plus 2 (Proteingrößenstandard)	Invitrogen
Trypsin (<i>porcine</i> , TPCK behandelt)	Promega

Synthetische Oligonukleotide

Primer aus cDNA-Sequenzen des Schweins abgeleitet (Datenbankeintrag: jns96_G04.f jns
Sus scrofa cDNA 5'):

ssTAUT.s1	ACGTCTGGCGTTTTCCATAC	Position 183 - 202
ssTAUT.as1	AGCCGATACCAGCAAACAAG	Position 368 - 349

Spezielle Einwegmaterialien

12-Lochplatten	Nunc
175-cm ² -Zellkulturflaschen	Nunc
75-cm ² -Zellkulturflaschen	Nunc
Deckgläschen	Fisher Scientific
Fluoreszenzplatten	Nunc
IPGphor-Streifen	Amersham Pharmacia
Küvetten	Sarstedt
Objekträger	Superfrost
Plastikpipetten (5; 10 und 25 ml)	Nunc
Reaktionsgefäße (0,2; 0,5; 1,5 u. 2 ml)	Eppendorf, Sarstedt
Reaktionsgefäße, silikonisiert (0,5; 1,5 u. 2 ml)	Biozym
Zellschaber	Dispenser
Zentrifugenröhrchen	Kontron, Sarstedt, Greiner
ZipTip	Millipore

Allgemeine Geräte

Dark Reader Transilluminator & Brille	MoBiTec
Durchlicht-Scanner	Umax
Digitaler Polarimeter, Model 241	Perkin Elmer
DNA engine DYAD	MJ Research
ELISA-Reader	BMG-Labtechnologies
Ettan Dalt II	Amersham Pharmacia
Färbeschale (lichtdicht)	Werkstatt TUD
FLA-3000 (Fluoreszenzscanner)	Fuji
Gelelektrophoreseapparatur	Werkstatt TUD
Geltrockner	Biometra
GeneQuant pro (UV/VIS-Spektralphotometer)	Pharmacia Biotech
Glashomogenisatoren	Dounce
Hamilton-Spritze	Hamilton-Bonaduz
Heizblock	Stuart Scientific
Immunschüttler	Heidolph
IPGphor-Apparatur	Amersham Pharmacia
pH-Meter	WTW

Protean II-Gelelektrophoreseapparatur	BioRad
Schüttler HS 501D	Janke & Kunkel
Spannungsgeräte	Consort E831, TUD
Spinnerflaschen	Schott
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad
Vortexer	Janke & Kunkel
Wasserbad	GFL
Zentrifugenröhrchen	Kontron

Zentrifugen

Centrifuge 5417R	Eppendorf
Centrifuge 5810	Eppendorf
LE-80K	Beckman
Megafuge	Heraeus
Tischzentrifuge	Fischer Scientific
Sorval RC-5B	DuPont
Speed-Vac Univapo 150 H	Uniequip
Variofuge RF	Heraeus

Massenspektrometrie und Chromatographie

ÄKTA basic	Amersham Pharmacia
Säule "µRPC C2/C18 ST 4,6/100"	Amersham Pharmacia
Trypsin, Sequencing Grade	Roche
Voyager-DE TM PRO Biospectrometry Workstation	PE Biosystems

Zellkultur und Mikroskopie

Adultes bovines Rinderserum	PAA
BHS-Transwellsystem	Esplora
Brutschrank	Binder
Gehirne aus Schwein	Schlachthof Bensheim
Gentamycin	Biochrom
Hanks' Puffer	PAA
Immersionsöl	Merck
Kaiser's Glyceringelatine	Merck
Kollagen G	Biochrom
Medium M199	Biochrom
Axiovert 200 (Fluoreszenzmikroskop)	Zeiss
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Rollmesser	Monopol
Sterilwerkbank	Heraeus

Datenbanken und Suchmasken

EMBL:	European Molecular Biology Laboratory, Data Library Nucleotide Sequence Database, Heidelberg http://www.embl-heidelberg.de http://www.ebi.ac.uk/clustalw
NCBI:	National Center for Biotechnology Information, USA http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
SWISS-PROT:	Department de Biochimie Medicale Centre Medical Universitaire, Genf, Schweiz http://www.swissport.com
Expasy:	ExPASy Molecular Biology Server Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) http://www.expasy.ch
Mascot:	Matrix Science Ltd., London, UK http://www.matrixscience.com/cgi/index.pl?page=/
ProFound:	ProFound © 1995-2000 Wenzhu Zhang and Brian T. Chait. http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe

Computerprogramme

Analyst QS
Data Explorer
PDQuest™ Version 7.0
Z3

Applied Biosystems
Applied Biosystems
Bio-Rad
Compugen

Kalibriersubstanzen

Kalibriersubstanz-MALDI:
Standard 1 und 2
Des-Arg1-Bradykinin
Angiotensien 1
Glu1-Fibrionpeptid B
ACTH (1-17)
ACTH (18-39)

PE Biosystems

(M+H⁺ =904,4681 m/z),
(M+H⁺ =1296,6853 m/z),
(M+H⁺ =1570,6774 m/z),
(M+H⁺ =2093,0867 m/z),
(M+H⁺ =2465,1989 m/z)

4 Methoden

4.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

PBS ²⁻ -Puffer:	140 mM	Natriumchlorid
	8 mM	Dinatriumhydrogenphosphat
	1,5 mM	Kaliumdihydrogenphosphat
	3 mM	Kaliumchlorid
		pH 7,4
Earle's Puffer:	120 mM	Natriumchlorid
	5 mM	Kaliumchlorid
	1 mM	Natriumdihydrogenphosphat
	0,8 mM	Magnesiumsulfat
	1,6 mM	Calciumchlorid
		pH 7,2
	nach dem Autoklavieren steril zusetzen:	
	5,4 mM	Glucose
	26 mM	Natriumhydrogencarbonat
Rabilloud-Puffer:	7 M	Harnstoff
	2 M	Thioharnstoff
	filtrieren	
	4 % (w/v)	CHAPS

4.2 Charakterisierung von Glucuronolacton

4.2.1 Bestimmung der spezifischen Rotation

Die spezifische Rotation ist eine substanzspezifische Größe chiraler Moleküle, die Licht einer polarisierten Wellenlänge drehen können. Sie wurde in einem digitalen Polarimeter (Perkin Elmer) mit einer Natrium-Lampe als Lichtquelle bei einer Wellenlänge von 589 nm über eine Strecke von 10 cm gemessen. Hierzu wurde aus einer Substanzlösung definierter

Konzentration 2 ml Lösung in eine 10 cm Küvette gegeben und die spezifische Rotation über einen Zeitraum von mehreren Stunden gemessen.

4.2.2 Derivatisierung von Glucuronolacton mit PMP (Suzuki et al., 1998)

Lösungen: 0,3 M Natronlauge
0,3 M Salzsäure
0,5 M PMP in 100 % Methanol

Glucuronolacton wurde durch Natronlauge spontan hydrolysiert und die entstehende reduzierende Glucuronsäure an 1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolon (PMP) gekoppelt. Das Absorptionsmaximum des entstandenen PMP-Derivat liegt im UV-Bereich bei einer Wellenlänge von 245 nm. Die PMP-Derivate konnten aufgrund hydrophober Wechselwirkungen mittels HPLC getrennt und UV-spektrometrisch nachgewiesen werden. Die Derivatisierung erfolgte nach folgendem Schema mit 100 µl Probe als Ausgangsmaterial:

- | | | |
|-------------------|------------------------------------|--|
| 1. Hydrolyse | + 20 µl 0,3 M Natronlauge | 20 sec vortexen |
| 2. Kopplung | + 20 µl 0,5 M PMP | 20 min Inkubation bei 70 °C |
| 3. Neutralisieren | + 20 µl 0,3 M Salzsäure | 20 sec vortexen |
| 4. Extraktion | + 100 µl Aqua bidest. | |
| | 3 x + 200 µl Chloroform | 20 sec vortexen, 30 sec zentrifugieren bei 1000 g, Chloroform abziehen |
| 5. Probenauftrag | 20 µl Probe auf die HPLC auftragen | |

4.2.3 HPLC-Analysen

Puffer: 1 M Natriumdihydrogenphosphat
1 M Dinatriumhydrogenphosphat
30 mM Natriumphosphat, pH 7,0

Die Proben aus dem Transwellversuch (s. 4.7.9) wurden mittels „High Performance Liquid Chromatography“ (Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie; HPLC) analysiert. Die aus der Derivatisierung der Proben erhaltene konjugierte PMP-Glucuronsäure, PMP-Glucose und das freie, nicht konjugierte PMP wurden über eine C₂/C₁₈-Säule getrennt und die Menge an Glucuronsäure und Glucose bestimmt. Die Säule wurde mit 30 mM Phosphatpuffer

pH 7.0 äquilibriert und anschließend wurden 20 µl Probe auf die Säule injiziert. Das PMP und dessen Derivate interagierten über hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial. Eluiert wurden die PMP-Derivate von der Säule durch einen kontinuierlich ansteigenden Acetonitrilgradienten. Die Elution der PMP-Derivate wurde mit Hilfe eines UV-Spektrometers bei einer Wellenlänge von 245 nm verfolgt und in einem Spektrum protokolliert. Die Elutionspeaks von Glucose und Glucuronsäure wurden jeweils durch Standardansätze identifiziert. Durch Integration des entsprechenden Peaks wurde seine Fläche berechnet, die in linearem Zusammenhang mit der eingesetzten Substanzmenge steht. Um der Fläche eines PMP-Glucuronsäure- oder PMP-Glucose-Peaks eine bestimmte Konzentration zuordnen zu können, wurde jeweils eine Eichreihe mit konjugiertem Glucuronolacton (von 0 bis 5,7 mM) bzw. Glucose (von 0 bis 10 mM) erstellt.

Tab. 2 HPLC-Parameter

Flussrate:	0,5 ml/min
Injektionsschleife:	100 µl
Drucklimit:	25 MPa
Säule:	µRPC C ₂ /C ₁₈ ST 4,6/100
Lösung A1	30 mM Phosphatpuffer, pH 7,0
Lösung B1	Acetonitril
Lösung A2	0,15 % (v/v) Phosphorsäure
Lösung B2	0.15 % (v/v) Phosphorsäure in Methanol

Tab. 3 HPLC-Programme, SV = Säulenvolumen

Equilibrieren	4,5 SV
Auftragvolumen	500 µl
Linearer Gradient (Lösung A1 und B1)	0 – 35 % Lösung B1 über 6,7 SV

4.3 Proteinchemische Methoden:

4.3.1 Proteinbestimmung (nach Bradford, 1976)

Roti-Quantlösung: 20 % (v/v) Roti-Quant (filtriert)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Zellextrakte wurde nach der Bradford-Methode durchgeführt. 20 µl der Proteinlysate oder eine Verdünnung derselben wurden in eine Halbmikroküvette gegeben und mit 980 µl Roti-Quantlösung vermischt. Nach 15 min Inkubation bei RT erfolgte die photometrische Bestimmung bei einer Wellenlänge von 595 nm. Als Eichreihe diente Bovines Serumalbumin (BSA) in den Konzentrationen 0,1 / 0,2 / 0,4 / 0,6 / 0,8 und 1,0 mg/ml.

4.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE/Laemmli, 1970)

Acrylamidlösung:	30,0 % (w/v)	Acrylamid
	0,8 % (w/v)	Bisacrylamid
SDS-Auftragspuffer:	62,5 mM	Tris
pH 6,8	20 % (v/v)	Glycerin
	4 % (w/v)	SDS
	5 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	0,001 % (w/v)	Bromphenolblau
APS-Lösung:	10 % (w/v)	Ammoniumperoxodisulfat
Elektrodenpuffer (10x):	0,25 M	Tris
	1,92 M	Glycin
	1 % (w/v)	SDS
Trenngelpuffer:	1,5 M	Tris
pH 8,8		
Sammelgelpuffer:	0,5 M	Tris
pH 6,8		

Tab. 4 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

12,5 % (w/v) Gel (2x)	Aqua bidest.	30% (w/v) Acrylamid	Gelpuffer	SDS 10 % (w/v)	APS 20 % (w/v)	TEMED
Trenngel	3,8 ml	5 ml	3 ml	120 µl	50 µl	5 µl
Sammelgel	2,45 ml	0,5 ml	1 ml	40 µl	20 µl	4 µl

Die analytische Trennung von Proteinen aufgrund ihrer molekularen Masse erfolgte durch 12,5 % (w/v) Polyacrylamidgele nach Laemmli (1970). Die Trenngelgröße betrug 8,4 x 6 cm. Die Proteinproben wurden vor dem Auftrag auf das Gel mit SDS-Auftragspuffer versetzt und dann 10 min bei 100 °C denaturiert. Von dem Proteinstandard wurden 4 µl eingesetzt. Die elektrophoretische Trennung bei 160 V lief solange bis die blaue Bande des Auftragspuffer kurz vor dem Gelende war.

4.3.3 Färbemethoden für SDS-Polyacrylamidgele

4.3.3.1 Silberfärbung (Blum et al., 1987)

Die Silberfärbung ist eine sensitive Methode, die es ermöglicht Proteinbanden ab 10 ng zu detektieren. Da es sich um eine Geloberflächenfärbung handelt, ist die Sensitivität allerdings direkt abhängig von der Geldicke. Die Silberfärbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- | | | |
|-----------------|---|--|
| 1. Fixieren | > 1 h | 50 % (v/v) Ethanol
12 % (v/v) Essigsäure |
| 2. Waschen | 2 x 20 min | 50 % (v/v) Ethanol |
| 3. Imprägnieren | 1 min | 0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat |
| 4. Waschen | 2 x 30 sec | Aqua dest. |
| 5. Färben | 20 min | 0,2 % (w/v) Silbernitrat |
| 6. Waschen | 2 x 30 sec | Aqua dest. |
| 7. Entwickeln | bis Banden
sichtbar wurden | 6 % (w/v) Natriumcarbonat
0,05 % (v/v) Formaldehyd (37 %) |
| 8. Waschen | kurz in Aqua dest.
dann in Aqua dest. mit Fixierlösung
schließlich über Nacht in Aqua dest. | |
| 9. Trocknen | im Geltrockner zwischen Cellophanfolie | |

4.3.3.2 Coomassie-Blau-Färbung (Burnette, 1981)

Färbelösung:	0,25 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blau R 250
	9,20 % (v/v)	Essigsäure
	45,40 % (v/v)	Ethanol
Entfärbelösung:	10 % (v/v)	Essigsäure
	30 % (v/v)	Ethanol

Mit Coomassie Blau können Proteinbanden ab 200 ng detektiert werden. Die Fixierung und Färbung der Gele erfolgte in einem Schritt durch 20 min Inkubation unter leichtem Schütteln in Färbelösung. Das Gel wurde danach solange in Entfärbelösung inkubiert bis die Banden deutlich sichtbar wurden. Anschließend wurden die Gele im Geltrockner zwischen Cellophanfolie getrocknet.

4.3.3.3 Sypro Ruby™-Färbung

Fixierlösung:	7 % (v/v)	Essigsäure
	10 % (v/v)	Methanol

Mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sypro Ruby™ können Proteine bis zu 10 ng durch Blau-Licht (420 - 500 nm) sowie durch Laser (Ex. 473 nm / Em. 575 nm) sichtbar gemacht werden. Dieser Farbstoff eignet sich besonders zum Färben von Polyacrylamidgelen, deren Proteine anschließend identifiziert werden sollen, da er mit analytischen Techniken wie MALDI-MS kompatibel ist.

Die 2D-Gele wurden nach der zweiten Dimension für 30 min in Fixierlösung fixiert, in eine lichtdichte Wanne mit Sypro Ruby™ überführt und über Nacht unter leichtem Schütteln inkubiert. Die gefärbten Gele wurden 10 min in Fixierlösung gewaschen und anschließend mit dem Fluoreszenzscanner FLA-3000 gescannt. Die Auswertung der Gele erfolgte über die bildverarbeitende Software PDQuest™ 7.0 (BMEC) bzw. Z3 (Rattenhepatozyten).

4.3.4 Differentielle Detergenz Fraktionierung (DDF/Ramsby und Makowski, 1999)

4 x Stammlösung:	300 mM	Saccharose
	100 mM	Natriumchlorid
	10 mM	PIPES
	3 mM	Magnesiumchlorid
10 x Stammlösung:	10 mM	Natriumchlorid
	10 mM	PIPES
	1 mM	Magnesiumchlorid
PMSF-Stammlösung :	100 mM	PMSF in 100 % (v/v) Isopropanol p.a. (lichtgeschützt bei RT lagern)
Digitonin-Puffer: pH 6,8	10 mM	PIPES
	100 mM	Natriumchlorid
	3 mM	Magnesiumchlorid
	300 mM	Saccharose
	5 mM	EDTA
	1 mM	PMSF
	150 µM	Digitonin
Triton X-100-Puffer: pH 7,4	10 mM	PIPES
	100 mM	Natriumchlorid
	3 mM	Magnesiumchlorid
	300 mM	Saccharose
	5 mM	EDTA
	1 mM	PMSF
	0,5 % (v/v)	Triton X-100
Tween/DOC-Puffer: pH 7,4	10 mM	PIPES
	10 mM	Natriumchlorid
	1 mM	Magnesiumchlorid
	1 mM	PMSF
	1,0 % (v/v)	TWEEN-40
	0,5 % (w/v)	DOC

Tris-Puffer :	50 mM	Tris
pH 8,0	1 mM	Magnesiumchlorid

Die DDF dient zur Separierung zellulärer Proteine in vier strukturelle und funktionelle Fraktionen. Die vier Fraktionen bestehen aus cytosolischer-(1), Membran-/ Organellen-(2), Kern-(3) und cytoskelettaler-/ Kernmatrix-(4) Fraktion. Auf diese Weise können Teilproteome gezielter analysiert werden. Zudem ist die Methode gut für 2D-Gel-Analysen geeignet, da sie mit wenig Ausgangsmaterial und hoch reproduzierbar durchgeführt werden kann. Als Ausgangsmaterial wurden Zellsuspensionen (ca. 1×10^8 Zellen) von Rattenhepatozyten und BMEC aus Schwein verwendet.

1. Zellen Sedimentieren 10 min bei 650 g
2. Feuchtgewicht Zellsediment mit etwas PBS²⁻ in gewogene 2 ml Reaktionsgefäße überführen und wiegen (1 g = 1 ml Volumen)
3. Erste Fraktionierung Sediment in 5 Volumen Digitoninpuffer resuspendieren
20 min auf Eis schütteln
10 min bei 480 g zentrifugieren
Überstand = 1. Fraktion
Sediment in 600 µl Digitoninpuffer ohne Digitonin lösen
10 min bei 480 g zentrifugieren
4. Zweite Fraktionierung Sediment in 5 Vol. (des ursprünglichen Sedimentes, s.o.) Triton X-100-Puffer resuspendieren
30 min auf Eis schütteln
10 min bei 5.000 g zentrifugieren
Überstand = 2. Fraktion
Sediment in 600 µl Triton X-100-Puffer ohne Triton X-100 lösen 10 min bei 5.000 g zentrifugieren
5. Dritte Fraktionierung Sediment in 5/3 Volumen Tween/DOC-Puffer resuspendieren und in Dounce-Homogenisator überführen und homogenisieren
Proteinlösung 2 min in Ultraschallbad inkubieren
10 min bei 6.780 g zentrifugieren
Überstand = 3. Fraktion
Sediment in 300 µl Tween/DOC-Puffer ohne Tween/DOC lösen 10 min bei 6.780 g zentrifugieren

6. Vierte Fraktion Feuchtwicht des Sediments bestimmten
Sediment in 500 µl Tris-Puffer lösen
Suspension in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und im
Ultraschallbad wieder auftauen
10 µl Benzonase zugeben und bei 37 °C inkubieren bis das
Sediment vollständig gelöst ist
7 Volumen des Feuchtwichts an 5 % SDS-Puffer zugeben
20 min bei 90 °C inkubieren
Suspension = 4. Fraktion

Die vier Fraktionen wurden bei – 80 °C bis zur Acetonfällung gelagert.

4.3.5 Acetonfällung von Proteinen

Für die 2D-Gelelektrophorese mussten die vier Fraktionen der DDF auf ein 2D-Gelelektrophorese geeignetes Puffersystem umgestellt werden. Hierzu wurden die Proteine der vier Fraktionen mit Aceton gefällt und in Rabilloud-Puffer resuspendiert.

Die Proteinlösungen wurden mit eiskaltem Aceton auf 80 % (v/v) eingestellt und mindestens für 1 h bei - 20 °C inkubiert. Die gefällten Proteine wurden für 15 min bei 10.000 g sedimentiert und das Sediment in 80 % (v/v) kaltem Aceton gewaschen, d. h. 1 h bei - 20 °C inkubiert und anschließend 15 min bei 10.000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde abhängig von seinem Volumen in 2 - 4facher Menge Rabilloud-Puffer durch vortexen und Ultraschall resuspendiert und erneut 10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das eventuell erhaltene Sediment wurde verworfen. Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde mit der Bradford-Methode (s. 4.3.1) bestimmt, und die Proteinlösungen wurden dann für den späteren Gebrauch bei - 80 °C gelagert.

4.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE)

In der zweidimensionalen Gelelektrophorese werden Proteingemische durch zwei aufeinanderfolgende Schritte getrennt. In der ersten Dimension erfolgt die Trennung nach dem isoelektrischen Punkt (isoelektrische Fokussierung) mit der zweiten Dimension folgt dann eine Separierung nach der molekularen Masse (SDS-PAGE).

4.4.1 Erste Dimension: isoelektrische Fokussierung

Basis / Stockpuffer:	7 M	Harnstoff
	2 M	Thioharnstoff
	4 % (w/v)	CHAPS
	2,5 % (v/v)	IPG-Phor-Puffer
	91 mM	DTT
	Spatelspitze Bromphenolblau	
Auftragspuffer:	7 M	Harnstoff
	2 M	Thioharnstoff
	4 % (w/v)	CHAPS
	0,5 % (v/v)	IPG-Phor-Puffer
	18,2 mM	DTT
	Spatelspitze Bromphenolblau	

Während der isoelektrischen Fokussierung wurden die Proteine aufgrund ihres isoelektrischen Punktes in einem immobilisierten pH-Gradienten (IPG-Dry-Strip) durch das Anlegen eines elektrischen Feldes getrennt. Die Gradientengele waren auf Plastikstreifen angebracht und lagen in dehydratisierter Form vor. Eingesetzt wurden verschiedene pH-Gradienten unterschiedlicher Länge. Das Verwenden von immobilisierten Gradienten war wichtig, um eine hohe Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Das Probenvolumen und die Proteinmenge, die auf einen Gradienten aufgetragen wurden, waren abhängig von dem pH-Bereich und der Länge des Gradienten. Tab. 5 gibt einen Überblick über diese Parameter.

Tab. 5 Auftragsmenge für unterschiedliche pH-Gradienten

pH-Gradient	Länge [cm]	Auftragsvolumen [μ l]	Proteinmenge [μ g]
3 - 10	7	125	10
4 - 7	24	450	200
4 - 7	18	340	50

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte unabhängig vom Auftragsvolumen.

1. Rehydratisierung

Die Probenlösung wurde in die Rehydratisierungskassette gegeben, der IPG-Dry-Strip mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei eingelegt, mit Parafinöl überschichtet und für 12 - 16 h inkubiert.

2. Isoelektrische Fokussierung I

Die Gelstreifen wurden mit der Gelseite nach oben in Universal-Strip-Holder (Amersham Pharmacia) überführt. Mit Aqua dest. befeuchtete Whatman (3 mm) Papiere wurden jeweils überlappend mit dem Gelstreifen an beide Enden gelegt und die Elektroden darauf platziert. Die Streifen wurden mit Parafinöl überschichtet und in die IPGphor-Apparatur gelegt.

3. Isoelektrische Fokussierung II

Das Fokussierungsprogramm wurde abhängig von der Art der IPG-Dry-Strips gewählt. Die in Tab. 6 bis Tab. 8 dargestellten Programme wurden verwendet.

Tab. 6 IPG-Dry-Strip: pH 3 - 10; 7 cm

Schritt	Spannung [V]	Zeit [h] oder [Vh]	Spannungsverlauf
1	500	0,5	Stufe
2	1000	0,5	Stufe
3	8.000	8.000	Stufe

Tab. 7 IPG-Dry-Strip: pH 4 - 7; 24 cm

Schritt	Spannung [V]	Zeit [h] oder [Vh]	Spannungsverlauf
1	200	1	Stufe
2	500	1	Stufe
3	1.000	1	Stufe
4	8.000	1	Gradient
5	8.000	72.000 Vh	Stufe

Tab. 8 IPG-Dry-Strip: pH 4 - 7; 18 cm

Schritt	Spannung [V]	Zeit [h] oder [Vh]	Spannungsverlauf
1	100	1	Stufe
2	500	1	Stufe
3	1.000	1	Stufe
4	8.000	25.050 Vh	Gradient
5	8.000	70.000 Vh	Stufe

Nach der ersten Dimension wurden die Streifen in Plastikzylinder bei - 80 °C gelagert oder direkt in der zweiten Dimension weiter verwendet.

4.4.2 Reduzierung und Alkylierung von Cysteinresten (Görg et al., 1997)

Reduzierungspuffer: 6 M Harnstoff
pH 8,8 50 mM Tris
 30 % (v/v) Glycerin
 4 % (w/v) SDS

Alkylierungspuffer: 6 M Harnstoff
 50 mM Tris
 30 % (v/v) Glycerin
 4 % (w/v) SDS
 260 mM Iodacetamid
 Spatelspitze Bromphenolblau

Bevor die IPG-Dry-Strips nach der isoelektrischen Fokussierung in der zweiten Dimension nach molekularer Masse getrennt wurden, mußten die Proteine in den Gelstreifen in einem SDS-haltigem Puffer äquilibriert werden. Hierzu wurden in einem ersten Schritt die Disulfidbrücken durch DTT gespalten, dann erfolgte in einem zweiten Schritt die Blockierung der Cysteinreste durch Alkylierung mit Iodacetamid oder Acrylamid.

Die Gelstreifen wurden zunächst für je 15 min in 12 ml Reduzierungs-, dann in 12 ml Alkylierungspuffer unter Schütteln inkubiert. Direkt im Anschluss wurden die Gelstreifen in der zweiten Dimension eingesetzt.

4.4.3 Zweite Dimension: SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Stammlösungen und Puffer wie unter 4.3.2 beschrieben.

Agaroselösung: 0,5 % (w/v) Agarose in Elektrodenpuffer

Die Trennung nach der molekularen Masse in der zweiten Dimension erfolgte in einer Ettan Dalt II-Gelelektrophoreseapparatur der Firma Amersham Pharmacia. Die SDS-Polyacrylamidgele hatten eine Größe von 24 x 20 cm. Es wurden jeweils zwölf 12,5 %ige (w/v) Gele in einem Ettan Dalt Gelgießstand gegossen. Die Polymerisationslösung wurde vor dem Gießen entgast und die noch nicht polymerisierten Gele mit Isopropanol überschichtet. Die Gelstreifen wurden direkt nach der Alkylierung mit Elektrophoresepuffer benetzt, nach dem Abgießen des Isopropanols vorsichtig auf die Geloberfläche geschoben und dort mit warmer (nicht heißer!) Agaroselösung luftblasenfrei fixiert. Nach dem Platzieren der Gele in der Ettan Dalt II-Gelelektrophoreseapparatur wurde diese mit Elektrodenpuffer aufgefüllt. Der Elektrophoreselauf wurde mit 5 W/Gel bei einer konstanten Temperatur von 20 °C gestartet. Nachdem die Proteine aus den Gelstreifen in die SDS-Gele übergegangen waren (30 min) wurde die Leistung auf 55 W/Gel erhöht bis zu einem Maximalwert von 180 W. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Laufront 1 cm vom Gelende entfernt war. Die Gele wurden im Anschluss mit Sypro Ruby™ (s. 4.3.3.3) gefärbt und für die Spotanalyse eingescannt.

4.4.4 Spotanalyse mit Z3

Die Analyse der aus Rattenhepatozyten gewonnenen 2D-Gele wurde mit der Software Z3 von Compugen durchgeführt. Die Gele wurden zu Beginn in die beiden Gruppen „mit Glucuronolacton“ und „ohne Glucuronolacton“ eingeteilt. Für jede Gruppe wurde ein Referenzgel ausgewählt. Die Spots eines Gels wurden zuerst mit der automatischen Funktion „Spot Detection“ unter Verwendung folgender Parameter identifiziert:

Minimum Spot Area	200
Minimum Spot Contrast	200
Minimum Confidence Level	0.95
Remove Spiky Spots	an

Nach der Spoterkennung wurde jedes Gel einer Gruppe mit dem Referenzgel der Gruppe zur Deckung gebracht. Das Referenzgel wurde grün und das andere Gel violett dargestellt, so dass überlappende Bereiche (Spots) in Grauschattierungen dargestellt wurden. Dieser Vorgang erfolgte automatisch und wurde anschließend noch einmal manuell korrigiert.

Hierbei wurden Spots mit derselben Position in beiden Gelen miteinander zur Deckung gebracht und „verankert“. So wurden Fixpunkte im Gel geschaffen, die von dem Programm zur besseren Überlagerung der Gele in problematischen Bereichen genutzt wurden. Aus allen mit dem Referenzgel abgeglichenen Gelen einer Gruppe wurde über die Funktion „Create New Raw Master Gel“ ein Mastergel erstellt. Der dieser Funktion zugrunde liegende Algorithmus definiert Muster als signifikant, die in allen bzw. fast allen Gelen vorkommen und nimmt sie in das Mastergel auf. Muster, die nur in wenigen oder nur in einem Gel vorkommen, werden als Rauschen eliminiert.

Von den Mastergelen der beiden Gruppen wurde eines als Referenzgel ausgesucht und mit dem anderen (= Vergleichsgel) zur Deckung gebracht (s. o.). Anschließend wurde die Expression der Spots mit derselben Position in beiden Gelen mit der Funktion „Spot matching“ verglichen und die differentielle Expression berechnet. Die differentielle Expression ist das Verhältnis der Spotintensität in dem Vergleichsgel zu der Intensität des analogen Spots im Referenzgel. Z3 weist anhand dieser Berechnung jedem Spot eine Farbe zu, die wie folgt codiert ist:

- blau: Intensiverer Spot, d. h. der Spot ist im Vergleichsgel um den Faktor 3 stärker exprimiert als im Referenzgel (der Faktor ist frei wählbar und wurde für das Experiment mit 3 festgelegt).
- Gelb: Schwächerer Spot, d. h. der Spot ist im Referenzgel dreimal stärker exprimiert als im Vergleichsgel.
- Rot: Ein roter Spot taucht nur in einem der beiden Gele auf.
- Grau: Spots, die in beiden Gelen vorhanden sind und sich in ihrer Intensität nicht oder weniger als Faktor 3 unterscheiden.

Die „Matching“ Ergebnisse wurden manuell überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Die unterschiedlich exprimierten Spots wurden für die Spotisolierung in den original Gelbildern markiert und ausgedruckt. Für weitere pl/MW-Koordinaten wurden außerdem einige Landmarken (nicht unterschiedlich exprimierte Spots) für die Spotisolierung markiert.

4.4.5 Spotanalyse mit PDQuest™ 7.0

Zur Analyse unterschiedlicher auf BMEC basierender 2D-Gelsets wurde die Software PDQuest™ (Version 7.0) von BioRad verwendet. Die mit dem Fluoreszenzscanner erzeugten Gelbilder wurden in PDQuest™ ohne Manipulation importiert und dort mittels „Advanced Crop“ so zugeschnitten, dass die Außenbereiche der Gele ohne Spots entfernt wurden. Dieser Schritt diente zur Verringerung der Datei- bzw. Bildgröße und damit zur

Beschleunigung der Analyse. Darauf folgte eine automatische „Spot Detektion“ mit folgenden Parametern:

Spot Detection:	Sensitivity	100
	Size Scale	7
	Minimum Peak Height	500
Streak Removal:	Horizontal Radius	45
	Vertical Radius	45
Background:	Floating Ball, Radius	45
Smoothing:	Powermean, Kernal Size 7 x 7	

Die Parameter wurden an einem repräsentativen Gel (Referenzgel) erstellt und manuell an eine optimale Spot-Erkennung angepasst. Durch die Spot-Erkennung wurden aus einem Gelbild noch jeweils zwei weitere Datensätze („Filtered Image“ und „Gaussian Image“) generiert. Das „Filtered Image“ enthält die Daten des Gelbildes nach Einsatz aller verwendeten Filter, während im „Gaussian Image“ zusätzlich noch der Hintergrund entfernt und alle Spots einer Gauß-Verteilung angepasst wurden. Diese Verfahren wurde schließlich mit identischen Parametern zur Spot-Erkennung aller Gelbilder verwendet. Die Proteinquantität eines Spots wurde mit sein Volumen unter der Gauß-Glocke gleichgesetzt. Jeder detektierte Spot erhielt eine Kennung in Form einer SSP-Nummer (SSP = Standard Spot).

Hiernach wurden die Gele „normalisiert“, d. h. die Dichteintensität und damit das Volumen eines Spots wurde nicht in absoluten Werten ausgedrückt, was dunkler gefärbte Gele überproportional bevorteilt hätte, sondern in relativen Einheiten. Dabei wurden die Dichten aller gültigen Spots addiert und das Volumen des einzelnen Spots als relativer Anteil an der errechneten Gesamtmenge aller Spotintensitäten ausgedrückt (in ppm). Dadurch wurde eine hohe Vergleichbarkeit auch unterschiedlich stark gefärbter Gele erzielt.

Anschließend erfolgte das sogenannte „Matching“ bei dem die Spots eines Gels automatisch den entsprechenden Spots des Referenzgels zugeordnet wurden. Nach dem automatischen „Matching“ erfolgte eine manuelle Kontrolle und Korrektur dieser Zuordnung, d. h. nicht oder falsch zugeordnete Spots wurden ihrem tatsächlichen Gegenpart zugewiesen. Sehr kleine Spots (< 100 ppm) wurden beim „Matching“ nicht berücksichtigt, da ihr Proteingehalt als zu niedrig für die folgende MADLI-MS Analyse eingeschätzt wurde.

Nach erfolgreichem „Matching“ wurden die Gelbilder in zwei Gruppen, entsprechend ihrer ursprünglichen Herkunft eingeteilt. Diese dienten als Grundlage für die statistische Analyse der Daten. Drei Punkte wurden zur Analyse der Daten durch PDQuest™ berücksichtigt.

- „Qualitative Analysis“ sucht Spots, die ausschließlich in einer der Gruppen vorkommen.
- „Quantitative Analysis“ findet die Spots, die sich mengenmäßig von ihren Partnern der anderen Gruppe unterscheiden.
- „Statistical Analysis“ bietet die Möglichkeit, den Student's t-Test auf die Spots anzuwenden.

Diese „Analysis Sets“ konnten über Boole'sche Algebra miteinander verknüpft werden. Auf diese Weise wurde ein Set mit folgenden Analysen kombiniert:

„Qualitative Analysis“: Spots kommen nur in Gruppe 1 vor, aber nicht in Gruppe 2.

„Quantitative Analysis“: Spots, die in Gruppe 1 mindestens dreimal so intensiv (ppm) sind, wie in Gruppe 2.

„Statistical Analysis“: statistisch signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen in Bezug auf die Spotintensität nach Student's T-Test mit $\alpha = 1\%$.

Außerdem wurden nichtdifferentielle Spots mit hoher ppm-Zahl zufällig ausgewählt, um zusätzliche Proteine zu identifizieren, die dann als „Landmarken“ für weitere pI/MW-Koordinaten verwendet wurden.

Die mit dem „Analysis Set“ als differentiell gefundenen Spots sowie die Landmarken wurden in den Gelbildern markiert und für die Isolierung der Proteinspots ausgedruckt.

4.4.6 Isolierung von Proteinspots aus Polyacrylamidgelen

Die Spots, die durch softwaregestützte Analyse als unterschiedlich in den jeweiligen Gelpopulation eingestuft wurden, wurden aus den 2D-Gelen isoliert, hydrolysiert, um schließlich im MALDI-MS analysiert zu werden.

Die gescannten 2D-Gele wurden nochmals mit Sypro Ruby™ gefärbt (s. 4.3.3.3) und auf einen Blaulichttisch gelegt. Zur Vermeidung von Kontaminationen mit Keratin oder anderen Proteinen, wurde die Isolierung der Gelstücke in einer Sterilbank, mit Handschuhen und Maleranzug durchgeführt. Von 1 ml Plastikpipettenspitzen wurden etwa 0,5 cm abgeschnitten. Die Spitzen wurden jeweils kurz vor dem Gebrauch mit etwas HPLC-Wasser gefüllt. Danach wurden die auf einem Ausdruck der gescannten 2D-Gele markierten Proteine aus den Gelen ausgestochen und in 0,5 ml silikonisierte Reaktionsgefäße überführt. Das Wasser wurde von den Gelstücken im Reaktionsgefäß abgezogen und die Gelstücke dann bis zur Hydrolyse bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4.4.7 Hydrolyse von Proteinen

Stammlösung-Trypsin: 0,5 µg/µl Trypsin in 1mM HCl

Arbeitslösung-Trypsin: 0,05 µg/µl Trypsin in 1mM HCl

Die Hydrolyse der Proteine in Gelstücken erfolgte mittels Trypsin, um definierte Peptidfragmente für die MALDI-TOF-Analyse zu erhalten. Hydrolysiert wurden je 1 - 3 Proteinspots aus derselben Position verschiedener 2D-Gele einer Gruppe. Die Hydrolyse erfolgte in silikonisierten 0,5 ml Reaktionsgefäßen:

1. Waschen	2 x 20 min unter Schütteln	100 µl HPLC-H ₂ O
2. Entwässern	2 x 20 min unter Schütteln	100 µl 50 % (v/v) Acetonitril
3. Entwässern	1 x 15 min unter Schütteln	100 µl Acetonitril
4. Trocknen	ca. 10 min bei RT	
5. Quellen	10 min bei RT	2 µl 50 ng/µl Trypsinlösung 15 µl 50 mM Ammonium- hydrogencarbonat
6. Hydrolyse	6 – 16 h bei 37 °C	

Nach der Hydrolyse können die Peptide bei -30 °C bis zur MALDI-TOF-Analyse gelagert werden. Die Ausbeute der Hydrolyse wurde verbessert, wenn anstelle von 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat zum Quellen ein Gemisch aus 50 % (v/v) 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat und 50 % (v/v) Dimethylformamid verwendet wurde.

4.5 MALDI-TOF-MS

Die MALDI-TOF-MS-Analyse (Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry) wurde zur Molmassenbestimmung von Peptiden hydrolysierter Proteine verwendet. Die Nachweisgrenze dieser Analyse liegt im pmol bis fmol Bereich. Mit dieser Technik können kleine organische Verbindungen (Matrix) mit hoher Absorption im Laserwellenlängenbereich schlagartig und schonend in die Gasphase überführt und teilweise ionisiert werden. Die Ionisierung der Proben geschieht anschließend im Hochvakuum durch Übertragung der absorbierten Laserenergie von den Matrixmolekülen auf die Probe, was auch die Desorption (Herauslösen) der Probe aus der Matrix zur Folge hat. Als Matrixsubstanz eignet sich unter anderem α -Cyano-4-hydroxymizinsäure. Die Probe wird in einem großen Überschuss ($10^3 - 10^5$ x) gelöster Matrix gemischt und auf einem metallischen Probenhalter getrocknet. Durch Laserpulsbeschuss werden einfach geladene Ionen ($M+H^+$) freigesetzt. Die Massenanalyse der Ionen erfolgte in einen TOF-Analysator (TOF-MS, time of

flight) durch die Flugzeit der Ionen in einer sogenannten Driftstecke bis zum Detektor. Die Ionen erfahren alle dieselbe Beschleunigungsspannung (20 kV) wodurch die Flugzeit abhängig vom Masse/Ladungsverhältnis (m/z) ist und bei einfach geladenen Molekülen somit nur von der Masse abhängt. Durchgeführt wurden die Messungen mit einer Voyager-DE-Pro-Anlage der Firma Perkin Elmer.

4.5.1 Probenvorbereitung

Vorbereitung des Probenauftragstellers:

Zuerst wurde der Teller gründlich mit warmen Wasser gespült. Als nächstes wurde die Telleroberfläche für 10 min vollständig mit Acetonitril bedeckt und danach mit einer Bürste gereinigt. Dieser Vorgang wurde mit 50 % (v/v) Acetonitril und dann mit HPLC-H₂O wiederholt.

Matrix (gesättigt):	300 µl	Acetonitril
	300 µl	0,2 % Trifluoressigsäure
	Spatelspitze α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure	

Matrix 25 %:	200 µl	gesättigte Matrix
	300 µl	Acetonitril
	300 µl	0,2 % (v/v) Trifluoressigsäure

Größenstandard:	0,5 µl	Standard I
	0,5 µl	Standard II
	19 µl	gesättigte Matrix

Von dieser Lösung wurden 0,3 µl auf den Probesteller zum Kalibrieren gegeben.

Um die Peptidausbeute zu erhöhen, wurden die hydrolysierten Proteine verschiedener Peptidanreicherungsverfahren unterzogen. Danach wurden sie entweder ohne Matrix oder zusammen mit der Matrix auf eine Position eines Probestellers mit 100 Positionen gegeben.

4.5.2 Peptidanreicherung mittels ZipTip:

Nach der hydrolytischen Spaltung (s. 4.4.7) wurde die Probe durch Zugabe von 15 µl 0,2 % (v/v) Trifluoressigsäure angesäuert und 30 min unter Schütteln solubilisiert. Anschließend wurden 2 µl 2 % (v/v) Trifluoressigsäure zugegeben. Darauf folgte die Anreicherung über ZipTip:

1. Waschen der ZipTip	3 x 10 µl	50 % (v/v) Acetonitril
2. Waschen der ZipTip	3 x 10 µl	0,1% (v/v) Trifluoressigsäure
3. Peptidanreicherung	20 x 10 µl	Probenlösung aufziehen und wieder in Probe entleeren
4. Waschen	3 x 10 µl	0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure
5. Eluieren	1 – 2 x mit 25 % (v/v) Matrix auf Proben-teller eluieren (Matrix bis auf doppelte Säulenhöhe aufziehen)	
6. Trocknen	Matrix-Probenlösungsgemisch an der Luft trocknen lassen	
7. Messen im MALDI-Spektrometer (Voyager-DE™ PRO Biospectrometry Workstation)		

4.5.3 Peptidanreicherung ohne ZipTip:

Der Überstand der Hydrolyse wurde in ein silikonisiertes 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden die Spots 2 x mit 40 µl 60 % (v/v) Acetonitril / 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure extrahiert und alle Überstände vereinigt. Die Peptide wurden dann 3 h in der Speed Vac getrocknet. Anschließend wurden sie in 5 µl 5 % (v/v) Acetonitril / 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure resuspendiert. Von der Peptidlösung wurden 0,5 µl zusammen mit 0,5 µl 25 % Matrix auf den Proben-teller aufgetragen und trocknen gelassen. Die restliche Peptidlösung wurde in 0,5 µl Aliquots auf dieselbe Stelle des Proben-tellers aufgetragen und trocknen gelassen. Das letzte Aliquot wurde wieder mit 25 % Matrix aufgetragen. Nach dem Trocknen wurde die Probe 3 x mit 1 µl kaltem HPLC-H₂O gewaschen.

4.5.4 MALDI-MS-Messung

Die desorbierten, positiv geladenen Ionen werden zunächst durch eine Gegenelektrode (auch Gitter genannt) beschleunigt. Damit die Peptide, die schon während der Ionisierung eine Beschleunigung in Richtung der Driftstrecke erfahren haben, nicht genauso stark beschleunigt werden wie die anderen Peptide, wurde die Beschleunigungsspannung erst kurz (wenige Nanosekunden) nach der Ionisierung angelegt. Diesen Vorgang nennt man verzögerte Extraktion (Delayed Extraction/DE). Trotzdem können Ionen noch unterschiedliche kinetische Energie aufweisen und/oder in Fragmente gleicher Geschwindigkeit aber unterschiedlicher Masse zerfallen. Dies wurde teilweise durch einen Reflektor (Ionenspiegel) kompensiert, der die Ionen abbremste und in Gegenrichtung wieder beschleunigte. Ionen mit höherer kinetischer Energie drehen erst später um, als Ionen mit niedriger Energie und erreichen somit den Detektor gleichzeitig. Die so gewonnenen Spektren wurden mit dem Programm Data Explorer ausgewertet. Hierfür musste jedes Spektrum kalibriert werden. Die Kalibrierung erfolgte entweder intern durch autokatalytisch

entstandene Trypsinpeptide (842,509 Da, 2211,104 Da und 3013,324 Da) oder durch ein externes Standardgemisch von PE Biosystems (s. Material). In den kalibrierten Spektren wurden anschließend die Peptidpeaks ermittelt, die sich aufgrund der natürlichen Verteilung von Kohlenstoffisotopen in den Peptiden in mehrere Peaks mit $m/z + n$ aufteilen ($n = 0; 1; 2$ oder 3). Die Gesamtheit dieser charakteristischen Peptidpeaks und der daraus resultierenden Peptidmassen eines Spektrums ergaben die jeweilige Peptidmassenliste (PMF, Peptide Mass Fingerprint) der untersuchten Probe.

Verwendete Geräteparameter:

Beschleunigung	20 kV
Gitterspannung	75 %
Leitdraht	0,002 %
Verzögerungszeit	220 nsec
Massenbereich	750 – 3500 Da

4.5.5 Datenbankabfragen

Zur Identifizierung der hydrolysierten Proteine wurden die aus der MALDI-TOF-MS Analyse erhaltenen Peptidmassenlisten mit einer Datenbank (NCBI oder SWISS-PROT) verglichen. Die Suchmasken Mascot (<http://www.matrixscience.com>) und ProFound (http://129.85.19.-192/profound_bin/WebProFound.exe) berechnen aus bekannten Proteinen einer Datenbank die entsprechenden Peptidmassen durch virtuelle Hydrolyse mit einem definiertem Enzym. Ist die Übereinstimmung zwischen den experimentellen Daten und denen aus der Datenbank statistisch signifikant, gilt das Protein als identifiziert. Die statistische Signifikanz wurde durch den sogenannten Mowse Score (http://www.matrixscience.com/help/scoring_help.html) beurteilt. Sie war dann gegeben, wenn bei den verwendeten Suchkriterien (s. u.) ein Treffer mit einer Mowse Score von mehr als 66 bewertet wurde. Weitere Informationen zu den identifizierten Proteinen wurden aus verschiedenen Datenbanken (s. Material) entnommen.

Suchkriterien:

Tolerierte Massenabweichung	50 ppm
Zahl der ungenutzten Schnittstellen	max. 2
Feste Modifikationen	Cysteinreste sind alkyliert
Mögliche Modifikationen	Oxidation von Methionin sowie Phosphorylierung der Aminosäuren

4.6 Polymerase-Kettenreaktion - PCR (nach Sambrook & Russell, 2001)

Premix:	80 µl	HPLC-H ₂ O	
	10 µl	10 x Puffer	} aus HotStarTaq DNA Kit (Qiagen)
	2 µl	dNTP-Mix 10 mM	
	4 µl	Primer 1 10 pmol/µl	
	4 µl	Primer 2 10 pmol/µl	
	0,5 µl	Taq-Polymerase 5 U/µl	

Die PCR wurde zum Nachweis von *taut* in cDNA aus verschiedenen Geweben eingesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 25 µl (24 µl Premix + 1 µl cDNA) durchgeführt. Als Matrize diente cDNA aus Schweinegewebe.

PCR-Programm:	95 °C	15 min	denaturieren	
	94 °C	30 sec	denaturieren	} 40 Zyklen
	55 °C	30 sec	anlagern	
	72 °C	30 sec	verlängern	
	72 °C	7 min	verlängern	

Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in 2 %igen Agarosegelen analysiert (Sambrook & Russell, 2001).

4.7 Zellkulturtechniken:

Alle in der Zellkultur verwendeten Materialien, die unter der Sterilbank gebraucht wurden oder direkt mit den Zellen in Kontakt kamen, wurden entweder autoklaviert, im Trockenschrank bei 180 °C sterilisiert, mit 45 % (v/v) Isopropanol behandelt oder steril bezogen. Vor Arbeiten an der Sterilbank wurden die Hände oder Handschuhe und die Arbeitsfläche mit 45 % (v/v) Isopropanol oberflächlich desinfiziert.

4.7.1 Häufig verwendete Medien

M199 + ABS:	500 ml	M199
	5 ml	Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)
	5 ml	Gentamycin (10 mg/ml)
	50 ml	Adultes Rinderserum (ABS)

M199 serumfrei:	500 ml	M199
	5 ml	Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)
	5 ml	Gentamycin (10 mg/ml)

4.7.2 Isolierung von Schweinehirnendothelzellen (BMEC) aus Schweinehirnhälften (Mischeck et al., 1989)

Percollgradient:

Lösung A	74 ml	PBS ²⁻
	100 ml	Percoll
	11,1 ml	10 x M199

Lösung B	196 ml	PBS ²⁻
	44,1 ml	Percoll
	4,9 ml	10 x M199

Je 15 ml Lösung A (1,08 g/cm³) in einem 50 ml Gefäß vorlegen und vorsichtig mit 20 ml Lösung B (1,04 g/cm³) überschichten. Der Gradient wurde frisch angesetzt und bei + 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

Lysepuffer:

A: 5-fach	660 mM	Ammoniumchlorid
	25 mM	Kaliumchlorid
	4 mM	Dinatriumhydrogenphosphat
	8,8 mM	Kaliumdihydrogenphosphat
	25,2 mM	Glucose

B: 2,5-fach	10 mM	Magnesiumchlorid
	2,25 mM	Magnesiumsulfat
	12 mM	Calciumchlorid

C: 5-fach	169 mM	Natriumhydrogencarbonat
-----------	--------	-------------------------

Es wurden 900 µl Puffer A, 450 µl Puffer B und 225 µl Puffer C mit 21 ml Aqua bidest. vermischt. Von dieser Lösung wurden je 9 ml mit 4,5 ml Earle's Puffer versetzt und als Lysepuffer eingesetzt.

Von den Schweinehirnhälften (37 Stück) wurden die Kleinhirne entfernt und die Großhirne unter fließendem kalten Wasser mit einer Pinzette von äußeren Blutgefäßen und den Hirnhäuten befreit. Anschließend wurden die Hirnhälften zunächst mit einem Skalpell, dann mit einem Rollmesser mechanisch zerkleinert und in ein Becherglas mit warmem Medium M199 überführt. Um eine weitere Homogenisierung zu erreichen, wurden 5 mg Dispase II pro Gramm graue Substanz hinzugegeben und die Suspension 3 h unter Rühren bei 37 °C inkubiert. Danach wurden je 100 ml der Suspension und 100 ml einer Dextranlösung in einen GS3-Zentrifugenbecher gegeben. Die Becher wurden jeweils 10 min gut geschüttelt, um eine vollständige Vermischung zu erreichen, die für die Sedimentation der Kapillaren essentiell ist. Die Zentrifugation erfolgte für 10 min bei 7.000 g (LE-80K Beckman) und der Überstand wurde dekantiert. Das Sediment wurde in 7,5 ml Medium M199 resuspendiert und in Spinnerflaschen überführt. Jeweils 6 Sedimente wurden in einer Spinnerflasche auf diese Weise vereinigt. Je 4 ml einer Collagenase-Lösung (7,5 mg/ml Collagenase D in Medium M199) und einer TLCK-Lösung (0,75 mg/ml TLCK in Medium M199) wurden in eine Spinnerflasche gegeben. In den Spinnerflaschen wurde die Suspension für 1 h bei 37 °C unter Rühren inkubiert. Danach wurden erneut 4 ml Collagenase-Lösung sowie 36 µl Benzonase pro Spinnerflasche zugegeben und für weitere 1,25 h bei 37 °C unter Rühren inkubiert. Anschließend wurde die Suspension einer Spinnerflasche auf drei 50 ml Gefäße verteilt und 10 min bei 110 g (Centrifuge 5810, Eppendorf) zentrifugiert. Die Sedimente wurden in Medium M199 resuspendiert und auf insgesamt drei 50 ml Gefäße verteilt und erneut für 10 min bei 110 g zentrifugiert. Jedes Sediment wurde in 40 ml Medium M199 resuspendiert und von dieser Suspension wurden jeweils 10 ml vorsichtig auf einen Percoll-Dichtegradienten gegeben. Dieser wurde für 10 min bei 1.800 g (Centrifuge 5810, Eppendorf) ohne Bremse zentrifugiert. Die mittlere Bande im Gradienten enthielt die Endothelzellen, die mit einer Pasteurpipette abgezogen und in ein 50 ml Gefäß überführt wurden. Die Endothelzellsuspension wurde mit Medium M199 auf 40 ml aufgefüllt und für 10 min bei 110 g zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 40 ml Medium M199 gewaschen. Daraufhin wurde das Sediment in Lysepuffer resuspendiert, um die ebenfalls enthaltenen Erythrocyten zum Platzen zu bringen. Die Suspension wurde wieder wie oben zentrifugiert. Der Lyseschritt wurde wiederholt. Das Sediment wurde noch zweimal mit Medium M199 gewaschen (10 min, 110 g, 40 ml) bevor das Sediment zum letzten Mal in 40 ml Medium M199 resuspendiert wurde. Diese Zellsuspension wurde verwendet, um die Endothelzellen in Zellkulturgefäßen auszusäen (1.400 µl Zellsuspension/175 cm² Kulturflasche).

Endothelzellen für 28 Kulturflaschen á 175 cm² wurden aus einer Präparation von 37 Schweinehirnhälften isoliert.

4.7.3 Beschichtung von Zellkulturgefäßen

Kollagen G-Stammlösung:	4 mg/ml
Kollagen G-Arbeitslösung	133 µg/ml
	in Aqua MilliQ

Von der Kollagen G-Arbeitslösung wurden je 2,5 ml für eine 175 cm², 1 ml für eine 75 cm² Zellkulturflasche und 0,2 ml pro Vertiefung einer 12-Lochplatte eingesetzt. Für Immunocytochemische Färbungen wurden in die Kavitäten der 12-Lochplatten vor der Beschichtung Deckgläser gelegt. In die Zellkulturflaschen wurde zur besseren Verteilung des Kollagens ein größeres Volumen vorgelegt, das anschließend wieder auf das angegebene Volumen reduziert wurde. Die Zellkulturschalen und 12 Lochplatten wurden anschließend bei 37 °C gelagert. Die Beschichtung mit Kollagen G erfolgte mindestens zwei Tage vor der Zellaussaat. Das Kollagen wurde kurz vor der Verwendung der Kulturgefäße abgesaugt.

4.7.4 Kultivierung von BMEC

Die adhärent wachsenden BMEC wurden in kollagenierten Kulturgefäßen bei 37 °C, 5 % CO₂ und wassergesättigter Luftatmosphäre kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle 2 - 3 Tage gewechselt bzw. direkt am Tag nach Aussaat oder Passage. Bei dem ersten Mediumwechsel in einem Kulturgefäß wurde zweimal mit auf 37 °C vorgewärmten PBS²⁻ gewaschen, bevor das frische Medium auf die Zellen gegeben wurde.

4.7.5 Subkultivierung von BMEC

Das Kulturmedium der konfluent gewachsenen BMEC wurde abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 2,5 % (w/v) Trypsinlösung bedeckt (≈ 5 ml für eine 175 cm² Kulturflasche).

Das Ablösen der Zellen wurde durch leichtes Klopfen der Kulturflasche auf die Arbeitsfläche beschleunigt und mikroskopisch verfolgt. Wenn die meisten Endothelzellen abgelöst, die Pericyten aber noch adhärent waren, wurde die Trypsinierung durch Zugabe von 5 ml serumhaltigen M199 gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Gefäß überführt und für 10 min bei 110 g zentrifugiert. Das Sediment wurde in frischem Medium resuspendiert und im Verhältnis 1 : 2 ausgesät.

4.7.6 Toxizitätstest

Fluorescein-Arbeitslösung: 2,4 μ M Fluoresceindiacetat
in Earle's Puffer

Die Vitalität der Zellen in Kultur wurde mit dem Substrat Fluoresceindiacetat überprüft. Die Substanz wird von lebenden und toten Zellen aufgenommen. In lebenden, stoffwechselaktiven Zellen wird das Fluoresceindiacetat zu Fluorescein umgesetzt, während in toten Zellen keine Reaktion stattfindet. Nach Anregung mit Licht mit einer Wellenlänge von 450 nm erzeugt das Fluorescein eine grünliche Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum bei 515 nm. Die Fluoreszenzintensität steht somit in direktem Verhältnis zur Vitalität der Zellen. Mit dieser Methode wurde untersucht, ab welcher Konzentration Glucuronolacton einen vitalitätsmindernden Effekt auf BMEC ausübt.

Als Ausgangsmaterial für diesen Test wurden konfluent gewachsene BMEC verwendet, die in einer 12-Lochplatte, nach 4 h in serumfreien Medium mit Glucuronolactonkonzentrationen von 0 bis 10 mg/ml inkubiert wurden.

Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit Earle's Puffer gewaschen. Pro Kavität wurden 100 μ l Fluorescein-Arbeitslösung zugeben und die 12-Lochplatte wurde für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung im ELISA-Reader (Ex. 440 nm / Em. 520 nm).

4.7.7 Immuncytochemische Färbungen

DAPI-Stammlösung:	4,4 mM	DAPI dilactat in Aqua bidest.
DAPI-Arbeitslösung:	2,2 μ M	DAPI dilactat in Aqua bidest.

Mit der immuncytochemischen Färbung wurden Antigene in zwei Schritten sichtbar gemacht. Zuerst wurden die Antigene durch Erstantikörper gebunden. Die Erstantikörper wiederum wurden durch Zweitantikörper gebunden, die eine Fluoreszenzmarkierung (Cy3 oder Cy2) trugen. Cy3 erzeugt nach Anregung mit Licht mit einer Wellenlänge von 550 nm eine rötliche Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum bei 570 nm. Cy2 wurde mit Licht mit einer Wellenlänge von 489 nm zu einer grünen Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum bei 506 nm angeregt. Zellkerne wurden mit einer DAPI-Lösung (blaue Fluoreszenz, Ex. 360 nm / Em. 460 nm) gefärbt.

Für immuncytochemische Färbungen wurden adhärent auf Glasplättchen in 12-Lochplatten wachsende BMEC verwendet. Die Färbung erfolgte nach folgendem Schema:

- | | |
|--------------------|--|
| 1. Blocken | 300 µl/Kavität für 30 min bei RT unter Schütteln 3 % (w/v) BSA in PBS ²⁻ /0,1 % (v/v) Triton X-100 |
| 2. Erstantikörper | verschiedene 1. AK verdünnt in Antikörperlösung (= Blockierlösung 1 : 30 verdünnt)
200 µl/Kavität für 30 min bei RT unter Schütteln |
| 3. Waschen | 3 x 5 min mit PBS ²⁻ bei RT unter Schütteln |
| 4. Zweitantikörper | verschiedene 2. AK verdünnt in Antikörperlösung (= Blockierlösung 1 : 30 verdünnt)
200 µl/Kavität für 30 min bei RT unter Schütteln |
| 5. Waschen | 1 x 5 min in PBS ²⁻ bei RT unter Schütteln |
| 8. DAPI-Färbung | DAPI-Arbeitslösung 200 µl/Kavität
2 min bei RT |
| 9. Waschen | 1 x kurz in PBS ²⁻ schwenken
1 x 5 min in PBS ²⁻ bei RT unter Schütteln
1 x 5 min in Aqua dest. bei RT unter Schütteln |
| 10. Trocknen | > 10 min bei 37 °C trocknen lassen |
| 11. Eindeckeln | Ein kleiner Tropfen Kaiser's Glyceringelatine (37 °C) auf das Deckglas geben, dieses dann mit den Zellen nach unten auf einen Objektträger legen und trocknen lassen |
| 12. Mikroskopieren | |

4.7.8 Transwellstudien am BHS-Modell (Franke et al., 2000)

Medium:	DMEM/Ham's F-12
	100 U/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
	100 µg/ml Gentamycin
	550 nM Hydrocortison

Für *in vitro* Experimente an der Blut-Hirn-Schranke wurde das BHS-Modell nach Franke et al. (2000) verwendet, das von der Firma Esplora zur Verfügung gestellt wurde. In diesem Transwellssystem (s. Abb. 7) wachsen BMEC adhären auf einem Filtereinsatz, der in der Kavität einer 12-Lochplatte eingehängt ist. Das Medium oberhalb des Filters (apikal) stellt die Blutseite dar, während das Medium unterhalb des Filters (basolateral) der Gehirnseite entspricht. Auf dem Boden der Kavität (also basolateral) wachsen adhären Astrocyten (C6-Zellen).

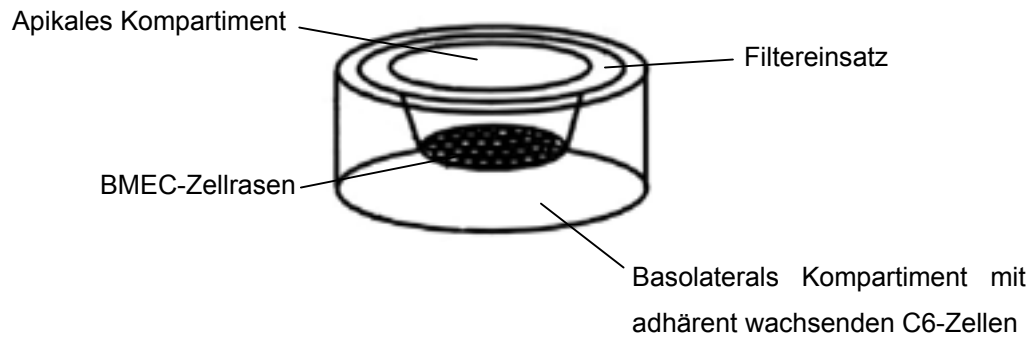


Abb. 7. Schema eines Transwell-Systems der Blut-Hirn-Schranke nach Franke et al, 2000.

Zur Untersuchung, ob eine Substanz die BHS überqueren kann, wird die entsprechende Substanz apikal in das Medium oder einen Puffer gegeben und nach einer bestimmten Inkubationszeit basolateral eine Probe genommen. Diese wird auf das Vorkommen der Substanz analysiert. Die Dichtigkeit des BMEC-Zellrasens wurde über Widerstandsmessungen vor den Transportstudien sowie durch Messung der Permeabilität von Na-Fluorescein, welches die BHS nicht passieren kann, überprüft. Die Anzucht der Zellen bis zur Konfluenz wurde in Medium DME/Ham's F-12 durchgeführt.

4.7.9 Transport von Glucuronolacton

Die Transportstudien mit Glucuronolacton wurden in dem oben beschriebenen Transwell-System durchgeführt. Die Transwellkavitäten wurden vor dem Experiment zweimal mit warmem (37 °C) Hanks' Puffer ohne Glucose gewaschen. Glucuronolacton wurde in Hanks' Puffer mit 10 µM Na-Fluorescein gelöst und 500 µl apikal/Kavität zugegeben. Basolateral wurden 1.500 µl Hanks' Puffer mit und ohne Glucose eingesetzt. Die Probenentnahmen von 100 µl erfolgten zu verschiedenen Zeitpunkten ohne Auffüllen der Lösung (außer bei t = 0). Tab. 9 gibt einen Überblick der verschiedenen Ansätze.

Tab. 9 Transportstudien mit Glucuronolacton. A = apikal, B = basolateral

Ansatz	Apikal: 10 µM Na-Fluorescein in Hanks' Puffer	Basolateral: Hanks' Puffer mit (+) oder (-) ohne Glc	Probenentnahme [min]
3 x	1 mg/ml GlcLA	+	A0, A120; B0, B120
3 x	0 mg/ml GlcLA	+	A0, A120; B0, B120
3 x	1 mg/ml GlcLA	-	A0, A120; B0, B120
3 x	0 mg/ml GlcLA	-	A0, A120; B0, B120

Die Proben wurden bis zur HPLC-Analyse (s. 4.2.3) bei -20 °C gelagert oder direkt mit PMP umgesetzt (s. 4.2.2). Aus dem Verhältnis zwischen apikaler und basolateraler Stoffkonzentration wurde der Permeabilitätskoeffizient P_e über die Endothelzellschicht, wie von Franke et al. (2000) beschrieben, berechnet.

4.7.10 Widerstand und Permeabilität von Na-Fluorescein mit und ohne Glucuronolacton

Im Transwellsystem wurde untersucht, ob die Zugabe von Glucuronolacton im apikalen Kompartiment (der Blutseite im Modell) einen Einfluss auf die Dichtigkeit der BHS hat. Dies wurde anhand der Parameter Widerstand und Permeabilität von Na-Fluorescein überprüft. Hierzu wurden vier Ansätze mit jeweils sechs Transwellkavitäten verwendet. Zum Zeitpunkt $t = 0$ wurden von jeder Transwellkavität der transendotheliale elektrische Widerstand (TEER) bestimmt. Anschließend wurde das alte Medium abgesaugt und durch das Medium M199 mit 100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin und 100 mg/ml Gentamycin ersetzt (je 500 μ l apikal und 1.500 μ l basolateral). In zwei Ansätzen wurde in das apikale Medium 0,1 mg/ml bzw. 1 mg/ml Glucuronolacton zugesetzt. Die beiden anderen Ansätze dienten jeweils als Kontrolle. Nach vier Stunden Inkubation im Brutschrank wurde erneut der TEER gemessen, das Medium abgesaugt und die Transwellsysteme mit Hanks' Puffer gewaschen. In jedes apikale Kompartiment wurden 500 μ l Hanks' Puffer mit 10 μ M Na-Fluorescein gegeben und in jedes basolaterale Kompartiment 1.500 μ l Hanks' Puffer. Darauf folgte eine zweistündige Inkubation im Brutschrank mit jeweils 50 μ l Probenentnahme apikal nach 0 und 120 min sowie basolateral nach 0, 20, 40, 60, 80, 100 und 120 min. Die Proben wurden zusammen mit einer Na-Fluorescein Eichreihe von 0 bis 20 μ M im ELISA-Reader gemessen. Fluorescein wurde mit Licht mit einer Wellenlänge von 480 nm angeregt und die dadurch entstehende Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 520 nm gemessen.

5 Ergebnisse

5.1 Allgemeine Eigenschaften von Glucuronolacton

Die Untersuchung der allgemeinen Eigenschaften von Glucuronolacton hatte zum Ziel, festzustellen, ob das verwendete Lacton in Lösung erhalten bleibt oder zum größten Teil in die freie Säure umgewandelt wird. Dies ist entscheidend, um die Ergebnisse der einzelnen Experimente richtig interpretieren zu können.

5.1.1 Stabilität von Glucuronolacton in wässriger Lösung

Die D-(+)-Glucurono-6,3-lacton-Lösungen wurden vor jedem Versuch frisch hergestellt. In wässriger Lösung stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Glucuronolacton und Glucuronsäure ein. Durch Messung der spezifischen Rotation (s. 4.2.1) einer frisch angesetzten Glucuronolactonlösung sollte geklärt werden, ob in den verwendeten Lösungen hauptsächlich das Lacton oder die Säure vorliegt.

Glucuronolacton dreht das Licht einer Na-Quelle laut Hersteller um $+18,5^\circ$ (80 mg/ml Lösung), während die Glucuronsäure in Lösung (60 mg/ml) das Licht derselben Quelle laut Hersteller um $+37^\circ$ dreht.

In Tab. 10 ist die Messung der spezifischen Rotation einer Glucuronolactonlösung mit 80 mg/ml über einen Zeitraum von mehreren Stunden dargestellt.

Tab. 10 Spezifische Rotation von Glucuronolacton (80 mg/ml) in Wasser.

Zeit [min]	10	15	93	160	1216	1299	1387
Spez. Rotation [$^\circ$]	17,1	17,2	17,6	17,75	18,06	18,3	18,4

Die Messwerte lagen dicht bei dem Wert, der für das Glucuronolacton erwartet wurde, so dass in den verwendeten Lösungen hauptsächlich das Lacton und nicht die Säure vorlag. Durch Zugabe von 10 μ l rauchender Salzsäure konnte eine schnellere Einstellung des Gleichgewichtes erreicht werden. Aber auch hier lag das Gleichgewicht nach mehreren Stunden noch auf der Seite des Lactons (s. Tab. 11).

Tab. 11 Spezifische Rotation von Glucuronolacton (80 mg/ml) in Wasser nach Zugabe von HCl.

Zeit [min]	6	61	112	1122	1390
Spez. Rotation [$^\circ$]	17,83	18,75	18,96	23,0	24,0

5.1.2 Veränderung des pH-Wertes durch Zugabe von Glucuronolacton in Lösung oder Medium.

Um auszuschließen, dass ein beobachteter Effekt aufgrund einer pH-Wert-Änderung auftritt und somit nicht substanzspezifisch ist, wurde der Einfluss des Glucuronolactons auf den pH-Wert untersucht. Eine ungepufferte Lösung wurde durch Glucuronolacton in einem kurzen Zeitraum deutlich angesäuert (s. Tab. 12). Der pH-Wert sank innerhalb der ersten 28 min nach Zugabe von Glucuronolacton um ca. 0,6 pH-Einheiten von pH 6,85 auf ca. pH 6,22 ab. Nach 150 min fiel der pH-Wert auf pH 4,69 und sank innerhalb der nächsten 195 min dann deutlich langsamer bis auf pH 4,16 nach 345 min.

Tab. 12 pH-Wert-Änderung von Wasser nach Zugabe von Glucuronolacton (1 mg/ml)

Zeit [min]	0	0,5	1	2	5	10	20	28	92	120	150	207	270	300	330	345
pH-Wert	6,85	6,78	6,77	6,74	6,67	6,55	6,36	6,22	5,32	4,95	4,69	4,46	4,28	4,23	4,18	4,16

In gepufferter Lösung oder gepuffertem Medium sank der pH-Wert nach 4 h hingegen nur sehr leicht (s. Tab. 13). Bei niedriger Glucuronolactonkonzentration (0,1 mg/ml) war keine pH-Wert-Änderung feststellbar. Mit einer zehnmal höheren Konzentration (1 mg/ml) wurde eine pH-Wert-Erniedrigung um 0,19 pH-Einheiten in Anwesenheit von Endothelzellen (BMEC) im Medium und um 0,34 pH-Einheiten in Abwesenheit von Zellen gemessen. Bei der höheren Konzentration wurde also eine leichte Abnahme des pH-Wertes beobachtet, wobei die Anwesenheit von Zellen diesen Effekt verringerte. In allen Versuchen wurden ausschließlich gepufferte Lösungen und Medien verwendet, wodurch starke pH-Wert-Änderungen durch Zugabe von Glucuronolacton vermieden werden konnten.

Tab. 13 pH-Wert in gepuffertem Medium M199 nach 4 h Inkubation bei 37 °C in Abhängigkeit von der Glucuronolactonkonzentration in Ab- und Anwesenheit von Zellen (BMEC).

pH-Wert mit Zellen	pH-Wert ohne Zellen	Glucuronolacton [mg/ml]
7,52	7,40	0,0
7,51	7,38	0,1
7,33	7,06	1,0

5.2 Wirkung von Glucuronolacton auf Rattenhepatozyten

In den folgenden Experimenten sollte die Wirkung von Glucuronolacton auf die Proteinexpression von Rattenhepatozyten mittels 2D-Gelanalysen untersucht werden. Die Leber und damit die Hepatozyten sind das Hauptentgiftungsorgan des Körpers. Deshalb sollte eine Veränderung der Proteinexpression im Zusammenhang mit Entgiftungsreaktionen durch Glucuronolacton hier gut zu beobachten sein.

5.2.1 Vitalitätstest

Als vorbereitendes Experiment wurde ermittelt, bis zu welcher Glucuronolactonkonzentration das Zellwachstum nicht beeinträchtigt wurde (durchgeführt von RCC, Roßdorf). In Abb. 8 ist die Vitalität von Hepatozytenkulturen in Abhängigkeit von der Glucuronolactonkonzentration dargestellt. Ab einer Konzentration von 2,5 mg/ml sank die Vitalität der Zellen von 100 % auf ca. 70 %, bei 5 mg/ml hatte die Vitalität um die Hälfte abgenommen, während bis zu einer Konzentration von 1 mg/ml kein vitalitätsmindernder Effekt gegenüber der Kontrollkultur beobachtet wurde. Bei einer Konzentration von bis zu 1 mg/ml konnte also ausgeschlossen werden, dass Änderungen in der Proteinexpression aus toxischen Effekten resultierten.

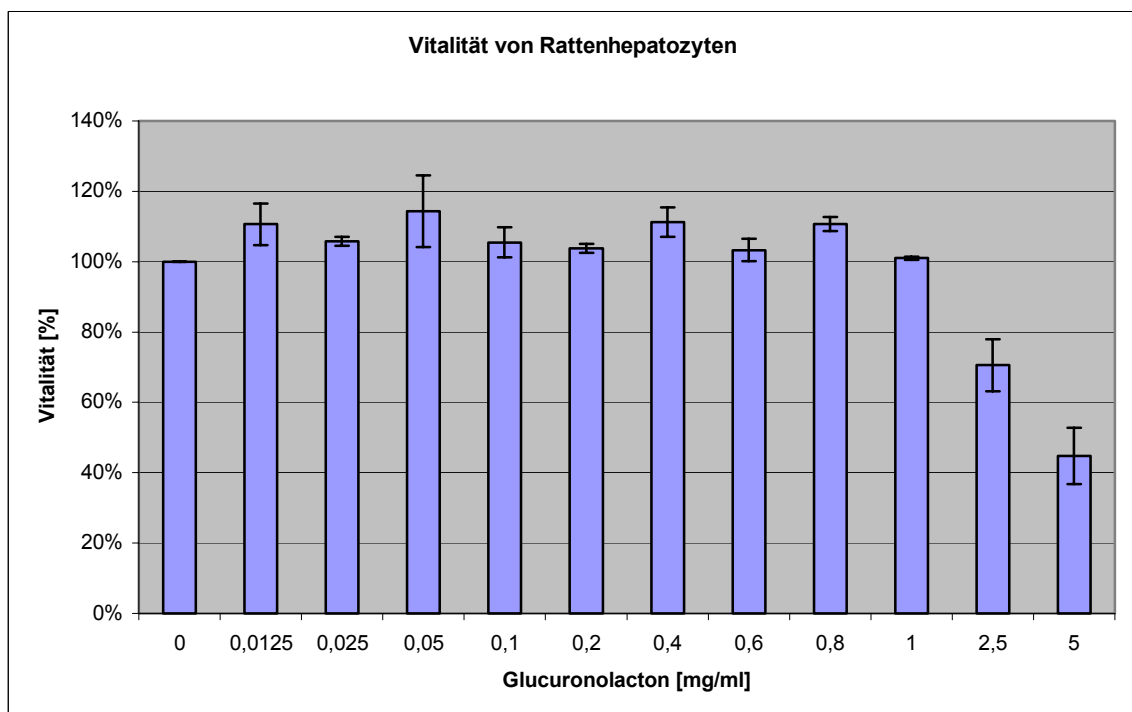


Abb. 8. Vitalität von Rattenhepatozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Glucuronolactonkonzentrationen nach 4 h Inkubation.

5.2.2 Kultivierung von Rattenhepatozyten

Für die Untersuchung der Wirkung von Glucuronolacton auf Leberzellen wurden kultivierte Rattenhepatozyten als Ausgangsmaterial verwendet. Zur Kultivierung der Rattenhepatozyten wurde eine Einwirkzeit von vier Stunden und eine Glucuronolactonkonzentration von 0,1 mg/ml gewählt. Die Konzentration wurde so gewählt, dass sie sich nicht vitalitätsmindernd auswirkte und gleichzeitig in einem physiologisch relevanten Bereich lag. Dabei wurde als Näherung angenommen, dass bei Konsum einer Dose (0,25 l) eines *Energy Drinks* (mit 2,4 mg/ml Glucuronolacton) die gesamte Glucuronolactonmenge direkt ins Blut gelangt. Dies würde bei ca. 6 Liter Blut zu einer Konzentration von 0,1 mg/ml im Blut führen. Die Einwirkzeit beruht auf der Annahme, dass spätestens nach vier Stunden eine eventuelle Veränderung in der Proteinexpression stattgefunden haben sollte. Es wurden je 1×10^8 Zellen, die mit bzw. ohne Glucuronolacton inkubiert wurden, von der Firma RCC (Roßdorf) zur Verfügung gestellt.

5.2.3 DDF-Zellaufschluss der Hepatozyten

Die Proteinisolierung aus den Hepatozytenzellen wurden mittels der differentiellen Detergenzfractionierung (DDF) durchgeführt (s. 4.3.4). Die DDF bietet den Vorteil gegenüber eines Gesamtaufschlusses, dass gezielt bestimmte Proteinklassen wie z. B. cytosolische Proteine oder Membranproteine angereichert werden können. Durch die DDF werden so auch Proteine angereichert, die in einem Gesamtaufschluss unterrepräsentiert wären. Es wird also ein größerer Teil des Proteoms in die Experimente einbezogen, wenn alle vier Fraktionen analysiert werden.

Tab. 14 gibt einen Überblick über die Proteinmenge der jeweiligen Fraktion, die aus den mit Glucuronolacton inkubierten Zellen und der Kontrollkultur (s. 5.2.2) isoliert wurde.

Tab. 14 Proteinmenge aus Rattenhepatozyten nach DDF-Aufschluss

Fraktion	Proteinmenge [mg] aus Zellen ohne Glucuronolacton	Proteinmenge [mg] aus Zellen mit Glucuronolacton
1. Cytosolische Proteine	2,5	2,3
2. Membranproteine	11,1	8,2
3. Zellkernproteine	1,5	2,2
4. Cytoskelettproteine	3,4	6,0
Summe	18,5	18,7

Die Proteinmenge der einzelnen Fraktionen unterschieden sich etwas, in der Summe wurde aber eine vergleichbare Menge Protein isoliert.

5.2.4 „Mini“ 2D-Gele mit pH 3 - 10

Die sogenannten Minigele (7 cm x 6 cm) dienen dazu, einen Überblick über die Proteinverteilung im 2D-Gel zu bekommen (s. 4.4). Um dabei einen möglichst großen pH-Bereich abzudecken, wurden für die 1. Dimension Streifen mit einem pH-Gradienten von pH 3 bis 10 gewählt. In Abb. 9 ist exemplarisch ein Minigel mit Proteinen der 4. Fraktion dargestellt.

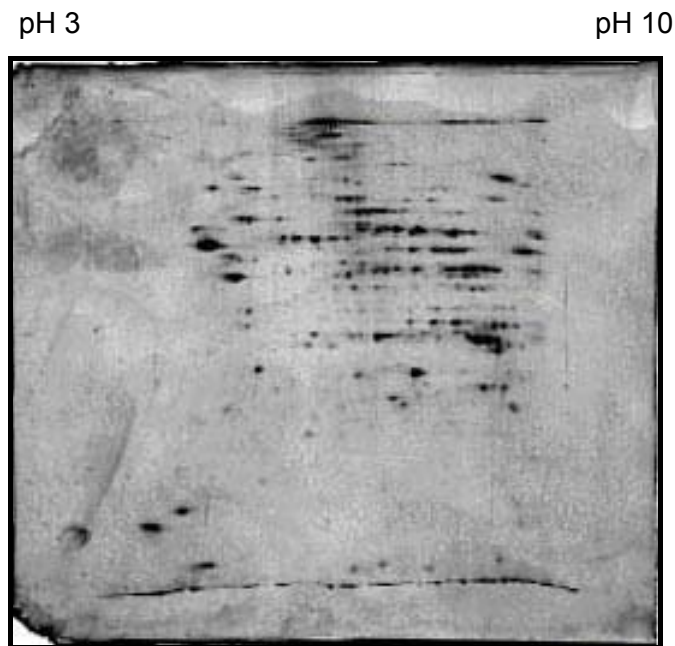


Abb. 9. Silberfärbung eines 2D-Minigels der 4. Fraktion der mit Glucuronolacton behandelten Hepatozyten mit pH 3 -10.

Wie auf dem Gel zu erkennen ist, lassen sich nur sehr wenige Proteine in den sauren (links) und alkalischen (rechts) Randbereichen des Gels detektieren. Die meisten Proteine befinden sich in einem Bereich von pH 4 - 7,5. Aus diesem Grund wurde für die 2D-Gelanalysen ein pH-Bereich von pH 4 bis 7 gewählt. Dies gewährleistet eine bessere Trennung und damit eine höhere Auflösung des größten Teils der Proteine im Gel. Dabei wurde in Kauf genommen, dass die wenigen Proteine aus den sauren und alkalischen Bereichen nicht für die Analyse zur Verfügung standen.

5.2.5 2D-Gelanalysen der aus den Hepatozyten isolierten Proteine

Ziel der 2D-Gelanalyse war es, Veränderungen in der Proteinexpression von Hepatozyten durch Behandlung mit Glucuronolacton nachzuweisen. Für die 1. Dimension wurde ein pH-Gradient von pH 4 - 7 über 24 cm verwendet. Die 12,5 %igen (w/v) Polyacrylamidgele der 2. Dimension trennten die Proteine über eine Strecke von 20 cm.

Die beiden Gruppen „mit“ und „ohne“ Glucuronolacton der Rattenhepatozyten wurden durch den DDF-Aufschluss jeweils in vier Untergruppen, die den vier Fraktionen entsprachen, unterteilt. In den 2D-Gelanalysen wurden jeweils dieselben Fraktionen der beiden Gruppen miteinander verglichen. Pro Fraktion und Gruppe wurden je sechs 2D-Gele angefertigt, so dass insgesamt 48 2D-Gele hergestellt wurden. Abb. 10 und Abb. 11 zeigen exemplarisch je ein Gel der 2. Fraktion. Die Auftragsmenge betrug jeweils 150 µg Protein.

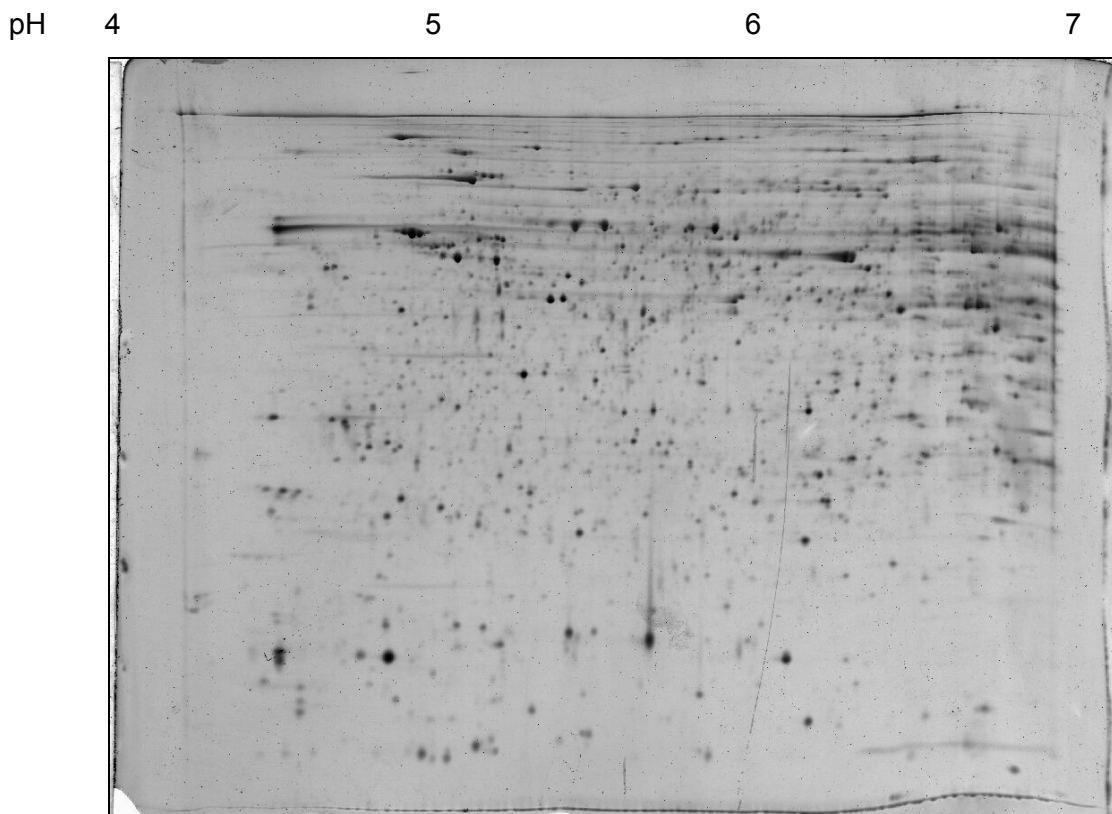


Abb. 10. Sypro Ruby™ gefärbtes 2D-Gel der 2. Fraktion aus Rattenhepatozyten aus der Gruppe „ohne Glucuronolacton“.

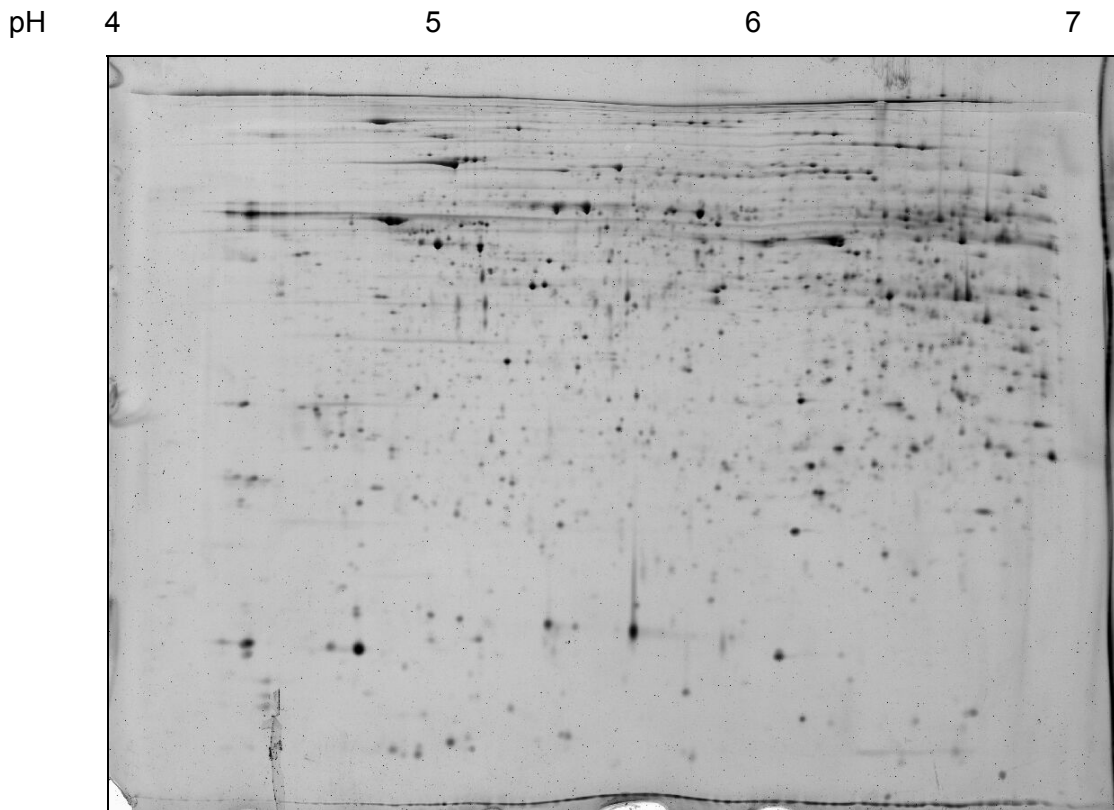


Abb. 11. Sypro Ruby™ gefärbtes 2D-Gel der 2. Fraktion aus Rattenhepatozyten aus der Gruppe „mit Glucuronolacton“.

5.2.6 Vergleich der Spotintensitäten

Die Spotintensitäten in den beiden Gelgruppen „mit“ und „ohne Glucuronolacton“ wurden in jeder der vier Fraktionen miteinander verglichen. Der Vergleich wurde durch die Software „Z3“ unterstützt (s. 4.4.4). Spots mit unterschiedlichen Intensitäten in beiden Gruppen wurden auf Ausdrucken der Gelbilder markiert und nummeriert, um anschließend die zugehörigen Proteine aus dem Gel isolieren zu können. Es wurden nur solche Spots als differentiell ausgewählt, die mindestens in fünf der sechs Gele einer Gruppe zu erkennen waren. Differentiell bedeutete, dass der Spot in der angegebenen Gruppe entweder ausschließlich oder aber mit höherer Intensität vorkam. Abb. 12 und Abb. 13 zeigen exemplarisch in je zwei Gelausschnitten die Spots 2 bzw. 6 aus der 1. Fraktion, die in den Gelen der Gruppe „mit Glucuronolacton“ deutlich intensiver waren, als in der Gruppe „ohne Glucuronolacton“.

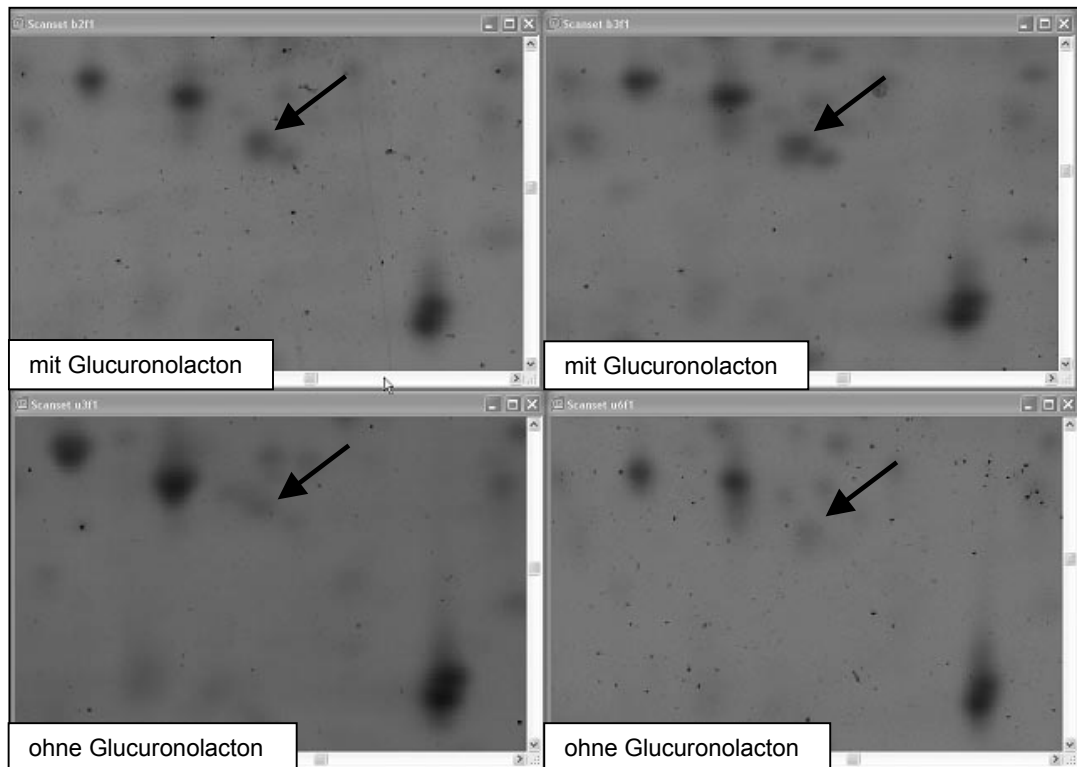


Abb. 12. Je zwei Ausschnitte der Gele der 1. Fraktion mit und ohne Glucuronolacton. Die Pfeile markieren jeweils die Position des Spots 2. Der Spot ist deutlich intensiver in den Gelen aus der Gruppe „mit Glucuronolacton“.

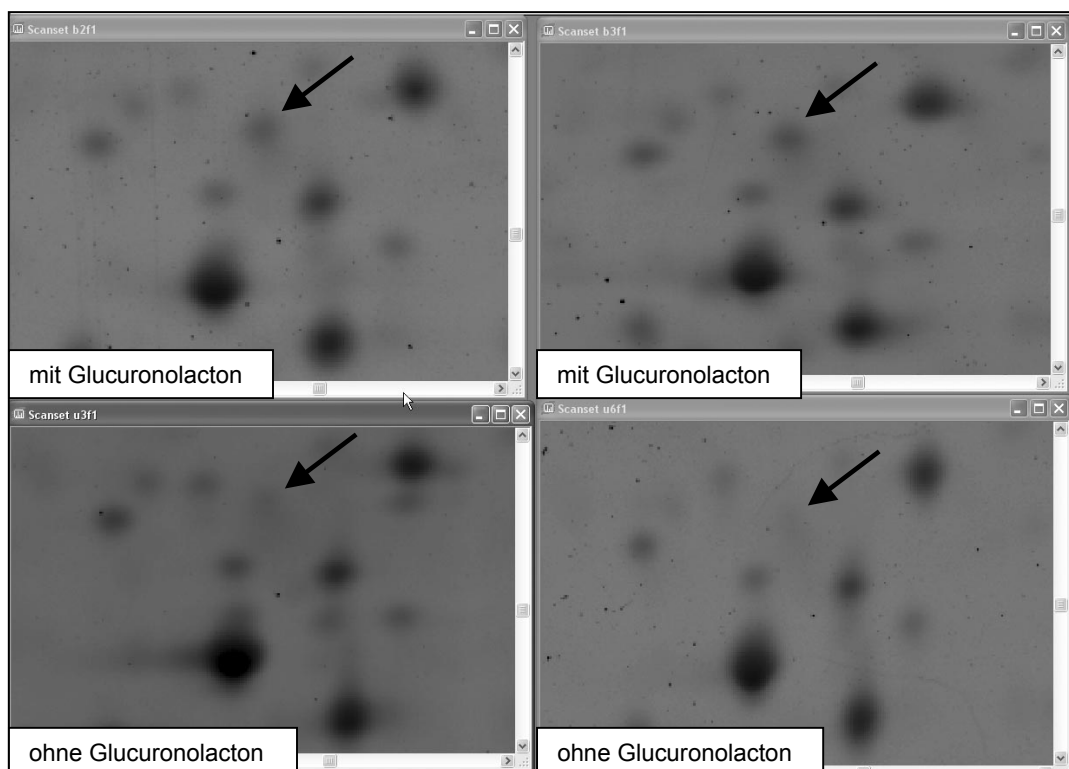


Abb. 13. Je zwei Ausschnitte der Gele der 1. Fraktion mit und ohne Glucuronolacton. Die Pfeile markieren jeweils die Position des Spots 6. Der Spot ist deutlich intensiver in den Gelen aus der Gruppe „mit Glucuronolacton“.

Tab. 15 gibt einen Überblick über die Anzahl der als differentiell ausgewählten Spots.

Tab. 15 Anzahl der im Gel als differentiell markierten Spots aus den Gelen der vier Fraktionen der beiden Gruppen „mit Glucuronolacton“ und „ohne Glucuronolacton“ sowie die Anzahl der Spots, die isoliert werden konnten.

	mit Glucuronolacton		ohne Glucuronolacton	
Fraktion	im Gel	isoliert	im Gel	isoliert
1. Cytosolische Proteine	16	11	2	1
2. Membranproteine	13	10	7	5
3. Zellkernproteine	25	16	6	6
4. Cytoskelettproteine	18	16	26	24
Summe	72	53	41	36

Je nach Qualität konnten die Proteine aus jedem differentiellen Spot 0 - 6 mal aus den Gelen einer Gruppe und Fraktion isoliert werden (s. 4.4.6). Manche Spots waren nur sehr schwach oder gar nicht zu erkennen, so dass sie nicht isoliert werden konnten. Für die MALDI-TOF-Analyse wurden die Proteine aus 1 - 3 identischen Spots in einem Ansatz mit Trypsin hydrolysiert und anschließend gemessen (s. 4.4.7). Die Auswertung eines MALDI-Spektrums und der anschließenden Datenbankrecherche ist im folgenden am Beispiel des Spots 6 der 1. Fraktion aus der Gruppe „mit Glucuronolacton“ gezeigt.

Aus den Peptidsignalen eines MALDI-Spektrums (s. Abb. 14) wurde eine Peptidmassenliste (PMF, Peptide Mass Eingerprint) für die Datenbankrecherche erstellt. Zur Unterscheidung der Peptidsignale vom Hintergrund diente die für Peptide typische isotopische Aufteilung der Signale. Diese beruht auf der Peptidzusammensetzung aus ^{12}C - und ^{13}C -Kohlenstoffatomen. Das erste Signal entspricht dem Peptid, das ausschließlich ^{12}C -Kohlenstoffatome enthält, für jedes Peptid mit ein oder mehreren ^{13}C -Kohlenstoffatomen erhöht sich die Peptidmasse um $m + n$ (n = Anzahl der ^{13}C -Atome).

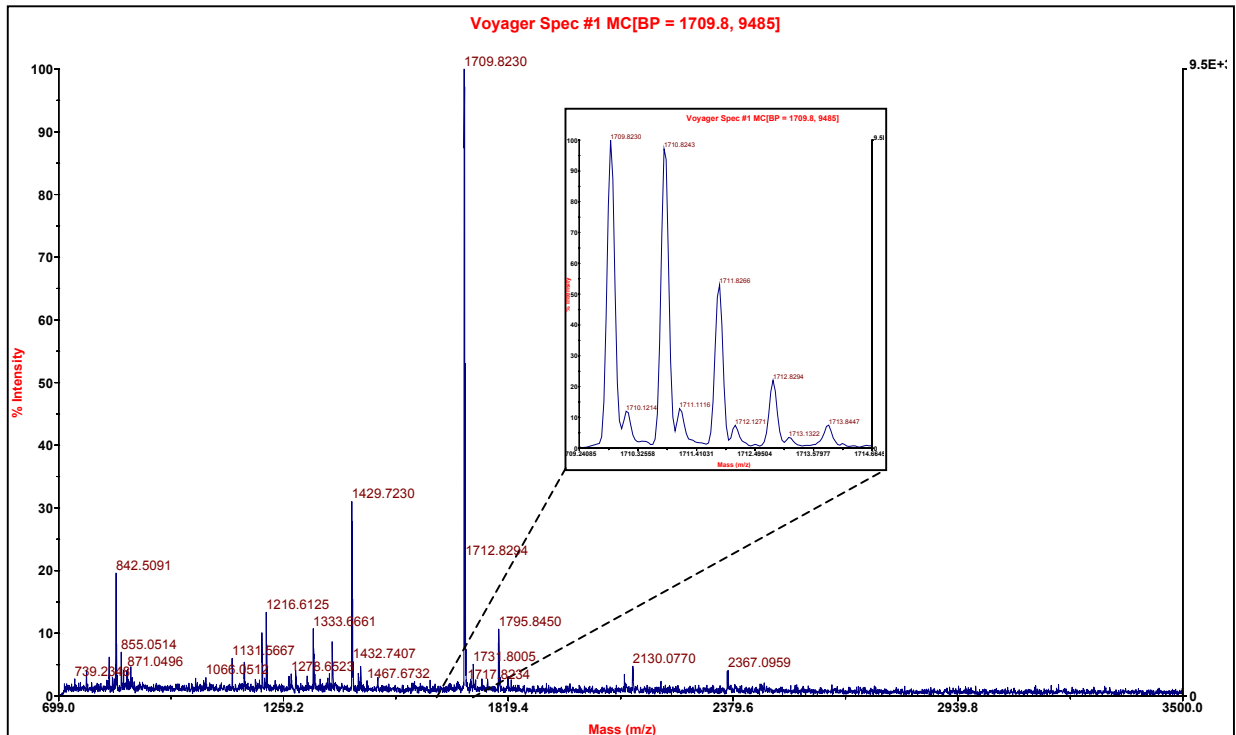


Abb. 14. MALDI-Spektrum des Spots 6 aus der 1. Fraktion der Gruppe „mit Glucuronolacton“. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt eine typische Peptidsignalfolge bedingt durch die isotopische Verteilung von ^{13}C -Atomen.

In Abb. 14 ist in der Ausschnittsvergrößerung eine typische isotopische Aufteilung eines Peptidsignals dargestellt. Aus den so erhaltenen Peptidmassen wurden die Peptidmassen entfernt, die durch Autohydrolyse von Trypsin oder Kontamination mit Keratin entstanden waren. Die restlichen Peptidmassen wurden über die Suchmaske der Programme Mascot oder ProFound für die Datenbankrecherche herangezogen (s. 3 „Datenbanken und Suchmasken“).

Die Peptidmassenliste aus der MALDI-Analyse wurde mit den Peptidmassen einer theoretischen Hydrolyse der Proteine der NCBI-Datenbank mit Trypsin verglichen. Als Suchkriterien wurde in der Regel eine Abweichung der Peptidmassen um 50 ppm sowie das Auslassen einer Spaltstelle des Trypsins während der Hydrolyse als tolerierbar festgelegt. Außerdem wurde neben der Alkylierung der Cysteine mit Jodacetamid (s. 4.4.2) ebenfalls eine Oxidation der Methioninreste als Modifikationen akzeptiert.

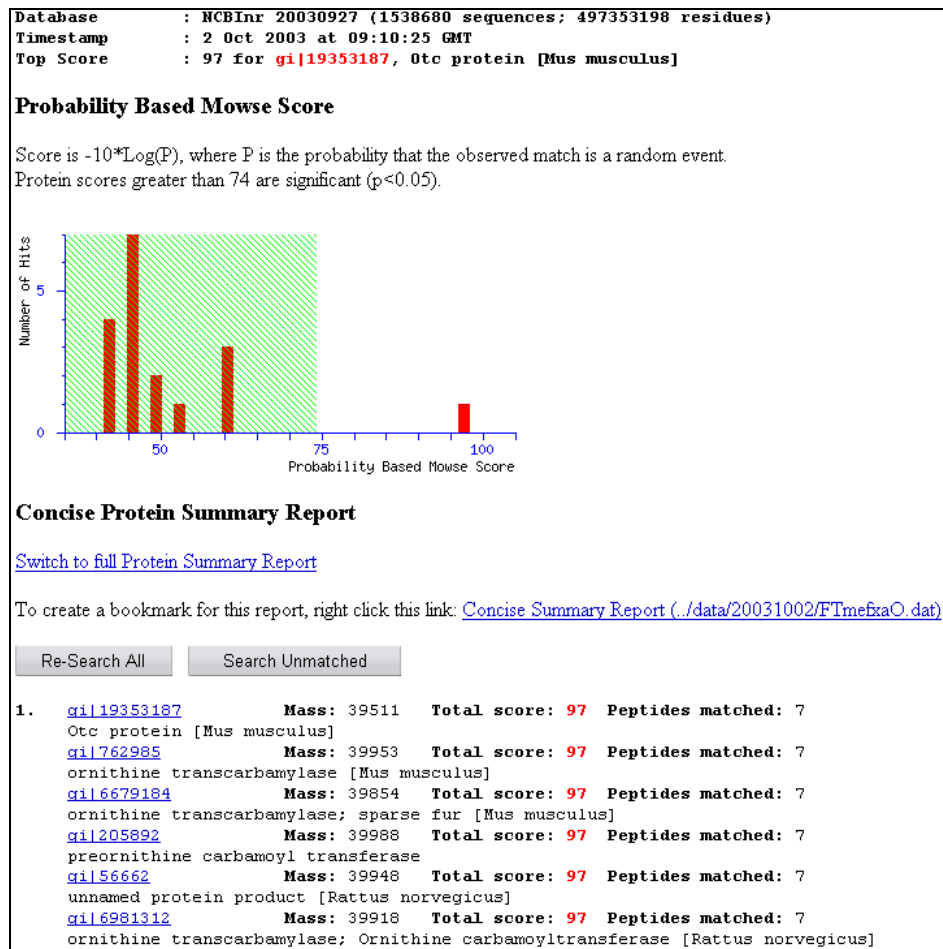


Abb. 15. Ergebnis der Mascot Datenbankabfrage des Spots 6 der 1. Fraktion aus der Gruppe „mit Glucuronolacton“. Die roten Balken stellen die Übereinstimmung der Peptidmassenliste mit den Peptidmassen der Datenbank dar. Liegt der Balken außerhalb des grünen Bereichs handelt es sich um einen signifikanten Treffer. Die Liste gibt einen Überblick über einige Parameter der Treffer. Hier handelt es sich um die Ornithin-Transcarbamoyltransferase.

Die Qualität eines Treffers aus dem Datenbankvergleich wurde durch den sogenannten Mowse Score bewertet (http://www.matrixscience.com/help/scoring_help.html). War dieser Wert größer als ein von den verwendeten Parameter abhängiger Schwellenwert (hier 74), handelte es sich um einen signifikanten Treffer. Das Ergebnis der Datenbankrecherche der Peptidmassenliste des Spots 6 ist in Abb. 15 gezeigt.

Außer dem Mowse Score und dem Namen des identifizierten Proteins lieferte die Suchabfrage noch einen detaillierten Ergebnisbericht zu der jeweiligen Recherche. Neben einem Verweis auf den ursprünglichen Datenbankeintrag, die Masse, den pI-Wert und die Sequenzabdeckung wurde auch angegeben, wie viele der durch MALDI-Analyse erhaltenen Peptide dem identifizierten Protein zugeordnet werden konnten (s. Abb. 16).

Protein View	
Match to: gi 6981312 ; Score: 97	
ornithine transcarbamylase; Ornithine carbamoyltransferase [Rattus norvegicus]	
Nominal mass (M_r): 39918; Calculated pI value: 9.12	
NCBI BLAST search of gi 6981312 against nr	
Unformatted sequence string for pasting into other applications	
Taxonomy: Rattus norvegicus	
Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:	
gi 129279 from Rattus norvegicus	
gi 66490 from Rattus norvegicus	
gi 205872 from Rattus norvegicus	
gi 205874 from Rattus norvegicus	
gi 205886 from Rattus norvegicus	
Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)	
Variable modifications: Oxidation (M)	
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P	
Number of mass values searched: 12	
Number of mass values matched: 7	
Sequence Coverage: 19%	
Matched peptides shown in Bold Red	
1	MLSNLRILLN KAALRKAHTS MVRNFRYQKP VQSQVQLEKGR DLLTLKNFTG
51	EEIQYMLWLS ADLKFRKQK GEYLPQLQK SLGMIFEKRS TRTRLSTETG
101	FALLGGHPSP LTTQDIHLGV NESLTDARV LSSMTDAVLA RVYKQSDLDI
151	LAKETATPIV NGLSDLYHPI QILADYLTQ EHYGSLKGLT LSWIGDGNNI
201	LHSIMMSAAK FGMHLQAATP KGYEPDPNIV KLAEQYAKEN GTRL SMTNDP
251	LEAARGGNVL ITDTWISMGQ EDEKKRLQA FQGYQVTMKT AKVAASDWTG
301	LHCLPR KPEE VDDEVFYSR SLVFPEAENR KWTIMAVMVS LLTDYSPVLQ
351	KPKF

Abb. 16. Ergebnisbericht aus der Mascotdatenbankrecherche (Teil 1). Angegeben sind allgemeine Proteinparameter (kDa, pI-Wert, zugehöriger Organismus), die Zahl der Peptidfragmente, die dem Protein zugeordnet werden konnten (7 von 12) und die Sequenzabdeckung dieser Peptidfragmente (rot) mit der Proteinsequenz (schwarz).

Die Sequenzabdeckung zeigt in rot die Peptidfragmente aus der MALDI-Analyse und in schwarz die Sequenz des identifizierten Proteins. Bei großen Abweichungen zwischen den erwarteten kDa und der kDa-Angabe aus der Datenbankabfrage konnte in der Sequenzabdeckung überprüft werden, ob möglicherweise nur ein Teil des vollständigen Proteins gefunden wurde.

Für die dem Spot 6 zugeordnete Ornithin-Transcarbamoyltransferase wurden 40 kDa angegeben. Dies deckt sich gut mit den experimentellen Daten (30 kDa) aus den 2D-Gelen. Die Differenz von 10 kDa lag noch im Rahmen der tolerierbaren Abweichung, da die experimentellen Daten über einen externen Proteingrößenstandard in einem separaten Gel ermittelt wurden. Der angegebene pI-Wert (9,12) entsprach nicht dem experimentellen Wert von pI 6 aus dem 2D-Gel. Von zwölf Peptidfragmenten konnten sieben dem Protein zugeordnet werden.

Der Ergebnisbericht der Mascotsuchabfrage (s. Abb. 17) stellt auch die Abweichung der einzelnen gefundenen Peptidmassen gegenüber den theoretischen Peptidmassen dar. Je kleiner die Abweichung war, desto besser war der Treffer. Eventuelle Modifikationen der Peptide z. B. durch Oxidation der Methioninreste wurden dabei ebenfalls berücksichtigt (s. Abb. 17). Die Massenabweichung der einzelnen experimentellen Peptidfragmente von den berechneten Peptidmassen betrug maximal 21 ppm. Drei Peptidfragmente enthielten je einen oxidierten Methioninrest. Eins der sieben Fragmente entstand durch eine unvollständige Hydrolyse, d. h. eine der Trypsinspaltstellen wurde nicht hydrolysiert. Das zugeordnete Protein wurde zudem in Ratten beschrieben. Insgesamt handelte es sich somit um eine erfolgreiche Datenbankrecherche und der Spot 6 wurde als Ornithin-Transcarbamoyltransferase identifiziert.

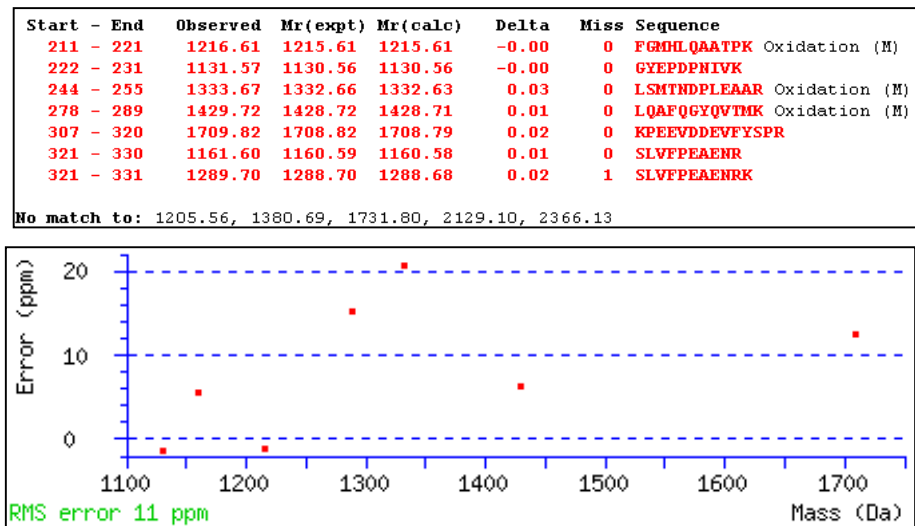


Abb. 17. Ergebnisbericht aus der Mascotdatenbankrecherche (Teil 2). Oben: Vergleich der identifizierten Peptidfragmente mit den theoretischen Peptidfragmenten unter Berücksichtigung zugelassener Modifikationen (Methionin-Oxidation). Unten: Abweichung der Masse der einzelnen Peptidfragmente von den jeweiligen theoretischen Werten in ppm.

Mit den Spektren der anderen Spots wurde analog verfahren. Die erfolgreich identifizierten Proteine sind in Tab. 16 zusammengefasst.

Tab. 16 Proteinliste der identifizierten Hepatozyten Spots. Org. = Organismus, Seq. = Sequenzabdeckung, DB = Datenbank, 2D = 2D-Gelanalyse, ▲▲ = um mind. Faktor 3 intensiver, ▲ = bis zu Faktor 3 intensiver in der Gruppe „mit Glucuronolacton“, ▼▼ = um mind. Faktor 3 intensiver in der Gruppe „ohne Glucuronolacton“, ↔ = in beiden Gruppen, aber deutlich verschoben.

Name	Spot	Fraktion	Org.	Peptide	Score	Seq.	Accession no	kDa (DB/2D)	pI (DB/2D)	Intensität
Hitze Schock Protein 90 (hs)/ hsp 84 (mo)	1	1	Hs	6 / 9	77	13%	17865718	73 / 60	5,1 / 5,7	▲▲
Hitze Schock Protein HSP 90- beta homolog (HSP 84)	3	1	Rn	3 / 3	1,72 Z	6%	10437873	84 / 45	5,1 / 5,2	▲▲
Glutathion S-transferase, alpha 2 Kette	5	1	Rn	6 / 14	86	29%	204493	26 / 24	8,9 / 5,8	▲
Ornithin-Transcarbamoyltransferase	6	1	Rn	7 / 12	97	19%	6981312	40 / 30	9,1 / 6	▲
Katalase	8	1	Bt	4 / 5	1,03 Z	7%	115698	58 / 48	6,4 / 6,3	▲
Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP/p23)	16	1	Mm/Rn	6 / 10	95	35%	6678437	20 / 25	4,8 / 4,75	↔
Apolipoprotein E Vorstufe (APO-E)	2	2	Rn	9 / 11	2,43 Z	28%	1703338	36 / 40	5,2 / 5,1	▲
Apolipoprotein A-I Vorstufe	4	2	Rn	7 / 10	2,43 Z	28%	113997	30 / 30	5,5 / 5,5	↔
Endoplasmatische Oxidoreduktase 1	10	2	Rn	8 / 12	2,16 Z	20%	19744821	55 / 75	5,8 / 5,9	▲▲
Septin 6	11	2	Mm	7 / 12	1,30 Z	17%	14714696	49 / 45	6,1 / 6,7	▲
Motor Protein (D21092)	1	3	Hs	9 / 16	2,26 Z	9%	516764	80 / 120	5,7 / 5,4	▲
Gelsolin	4	3	Hs	8 / 15	71	9%	4504165	86 / 130	5,9 / 5,9	▲▲
Catechol O-Methyltransferase	12 a	3	Rn	7 / 20	79	33%	1633081	30 / 60	5,4 / 5,8	▲▲
Cytokeratin 8 polypeptide	12 b	3	Rn	7 / 15	2,07 Z	18%	203734	53 / 60	5,5 / 5,8	▲▲
Cytokeratin 8 polypeptide	13	3	Rn	6 / 8	1,46 Z	13%	203734	53 / 60	5,5 / 6,1	▲
KIAA0103 Protein	18	3	Mm	6 / 11	84	20%	14193698	35 / 37	6,2 / 6,6	▲▲
Cytokeratin EndoB	12	4	Mm	7 / 13	2,21 Z	20%	532610	48 / 32	5,2 / 5,7	▲
Dismutase	E	3	Rn	5 / 8	2,38 Z	46%	818029	16	5,9 / 6,1	▼▼
Apolipoprotein A-I Vorstufe	F	3	Bt	5 / 6	2,37 Z	9%	113988	30	5,7 / 5,5	↔
Actin gamma - human (Fragment)	L	4	Hs	5 / 10	75	15%	86742	26 / 30	5,6 / 5,6	▼▼
Iodothyronin 5' Monodeiodinase	H	4	Rn	4 / 4	1,19 Z	8%	202549	54 / 28	4,9 / 4,9	▼▼
Hypothetisches Protein MGC37950	S	4	Mm	4 / 6	68	16%	21450107	19 / 20	5,2 / 5	▼▼
Aldehyd-Dehydrogenase	Z	4	Rn	6 / 8	2,33 Z	13%	16073616	49 / 50	6,1 / 6,3	▼▼

Die durch Glucuronolactonbehandlung und folgender 2D-Gelanalyse aus den differentiellen Spots isolierten und identifizierten Proteine der Rattenhepatozyten wurden in verschiedene funktionelle Gruppen eingeteilt. Abb. 18 zeigt, dass ein Drittel der identifizierten Proteine aus dem Entgiftungs- und Aminosäurestoffwechsel stammen, bei knapp einem Viertel handelt es sich um Strukturproteine, während ein Fünftel an Transportfunktionen beteiligt ist. Die restlichen Proteine verteilen sich auf verschiedene funktionelle Gruppen.

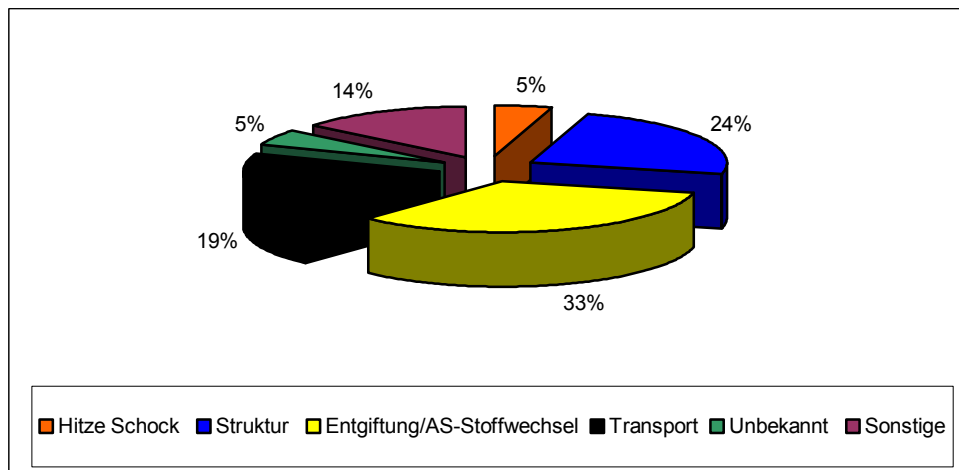


Abb. 18. Proteinverteilung der aus 2D-Gelanalysen von glucuronolactonbehandelten Hepatozyten identifizierten und als differentielle eingestuft Proteine.

5.3 Transwellstudien zum *in vitro* Transport an der BHS

Mit dem Transwellmodell der Blut-Hirn-Schranke (BHS) sollte untersucht werden, ob das Glucuronolacton die Schrankeneigenschaften der BHS beeinflusst und ob es über die BHS transportiert wird. Außerdem sollte die Expression des Taurintransportergens *taut* in dem hier verwendeten BHS-Modell nachgewiesen werden.

5.3.1 PCR-Analyse von *taut*

Die jeweils aus frisch isolierten BMEC, des Gesamthirn und Darms gewonnene cDNA (von T. Bangsow zur Verfügung gestellt) wurde mit spezifischen Primern (s. 4.6) auf die Expression von *taut* hin untersucht. In Abb. 19 ist die Agarosegelanalyse der PCR-Produkte gezeigt.

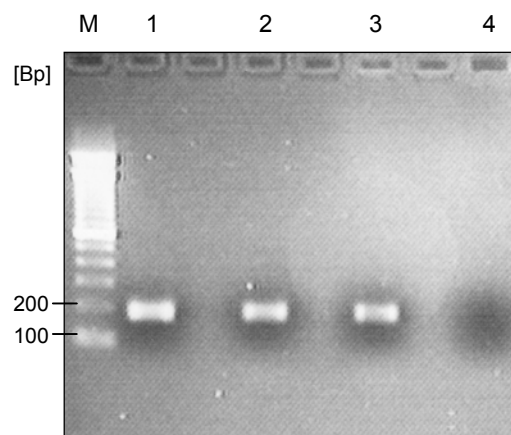


Abb. 19. 2 %iges Agarosegel mit den PCR-Produkten der *taut* spezifischen Primer in 1 = BMEC, 2 = gesamt Gehirn, 3 = Darm und 4 = Wasserkontrolle. Bp = Basenpaare, M = Proteingrößenstandard.

Die PCR-Produkte liegen knapp unterhalb der 200 Bp-Bande des Größenstandards und entsprechen damit den für *taut* erwarteten 186 Bp. Das Transkript von *taut* konnte in allen drei untersuchten Geweben nachgewiesen werden, d. h. zumindest die mRNA von *taut* wird in dem hier verwendeten BHS-Modell exprimiert.

5.3.2 Widerstand und Permeabilitätsmessungen

Der elektrische Widerstand und die Permeabilität von Na-Fluorescein über die BMEC-Zellschicht im Transwellsystem dienen als Marker für die Schrankenfunktion des BHS-Modells. Es wurde untersucht, ob Glucuronolacton in einer Konzentration von 0,1 mg/ml oder 1,0 mg/ml einen Einfluss auf den elektrischen Widerstand und die Permeabilität ausübt.

Dazu wurden je drei Transwellkavitäten mit den verschiedenen Glucuronolactonkonzentrationen und jeweils drei Kavitäten als Kontrolle für vier Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung des Widerstandes und der Permeabilität. Die Ergebnisse der Messung (s. Abb. 20) zeigten, dass die Anwesenheit von Glucuronolacton zu keiner Veränderung der Widerstände bzw. der Na-Fluoresceinpermeabilität führte. Die generelle Abnahme der Widerstände nach Behandlung erklärt sich durch das Fehlen von Hydrocortison im Versuchsmedium, da hier das gleiche Medium verwendet wurde, das auch in den 2D-Gelexperimenten zum Einsatz kam.

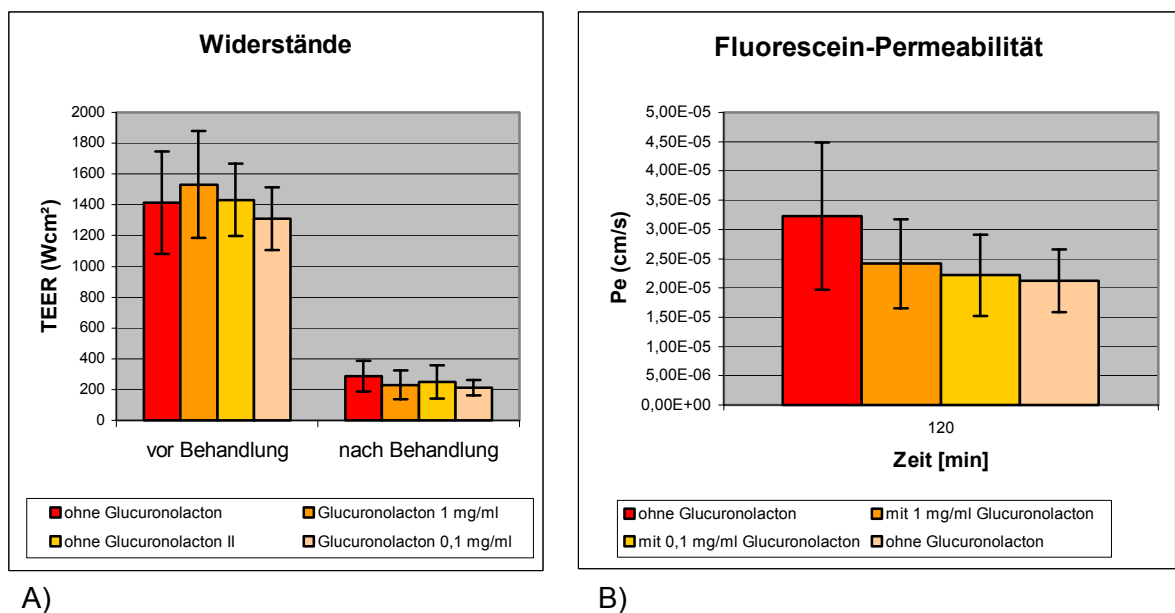


Abb. 20. A) Widerstände mit und ohne Glucuronolacton nach 4 h Inkubation.

TEER = *transendothelial electric resistance*. B) Fluorescein-Permeabilität mit und ohne Glucuronolacton nach 4 h Inkubation und anschließender Permeabilitätsmessung über 120 min. Pe = Permeabilität.

5.3.3 Transport von Glucuronolacton über die BHS

Durch Transportstudien von Glucuronolacton im Transwellssystem sollte geklärt werden, ob Glucuronolacton die BHS passieren kann.

5.3.3.1 Nachweis von Glucuronolacton und Glucose

Das Glucuronolacton in den Proben aus den Transportstudien wurde durch Natronlauge in die Glucuronsäure umgewandelt, die anschließend an 1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolon (PMP) gekoppelt wurde. Das Substrat dieser Reaktion absorbiert Licht mit einer Wellenlänge von 245 nm. Die Trennung der PMP-Glucuronsäure von den anderen in den Proben enthaltenen

Substanzen wurde durch RP-HPLC erreicht und bei einer Wellenlänge von 245 nm gemessen. Da PMP mit reduzierenden Zuckern reagiert, konnte neben Glucuronsäure auch Glucose in den Proben nachgewiesen werden.

Abb. 21 zeigt ein Spektrum einer solchen HPLC-Analyse. Die einzelnen Signale von ungebundenem PMP, der PMP-Glucuronsäure und der PMP-Glucose waren deutlich zu erkennen. Wie oben erwähnt, wurde für die Derivatisierung mit PMP das Glucuronolacton in Glucuronsäure umgewandelt.

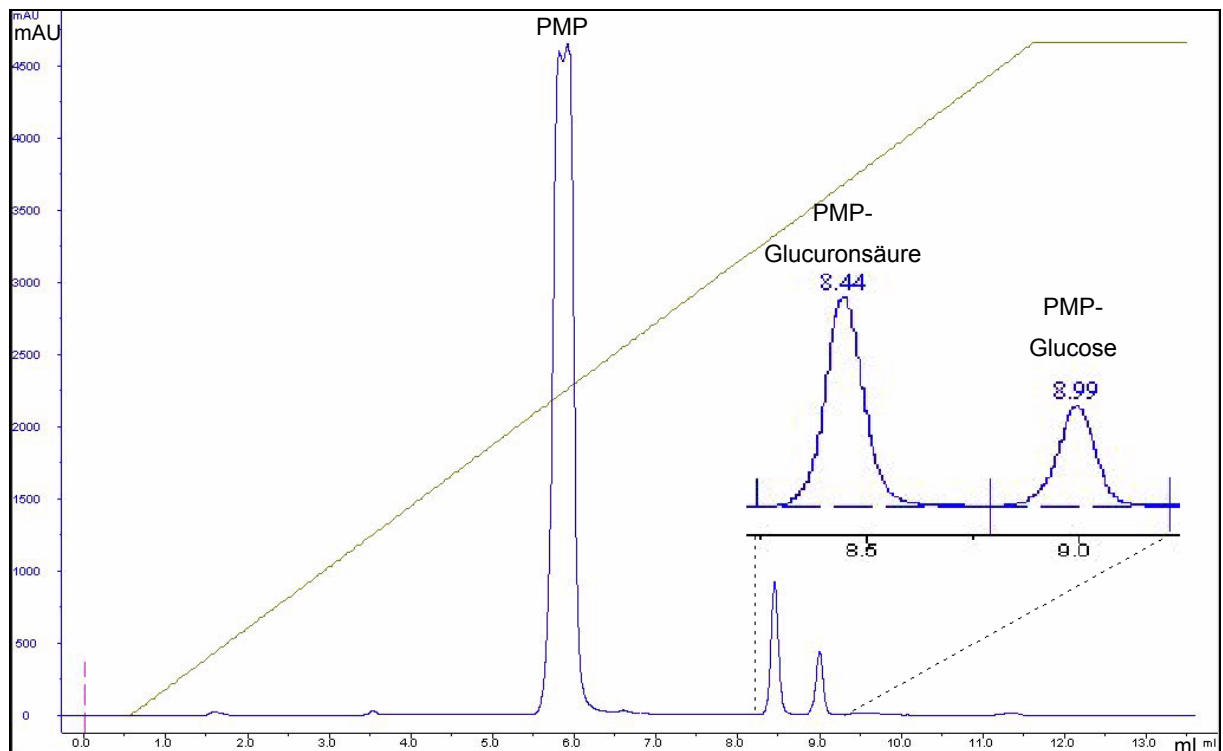


Abb. 21. Spektrum einer RP-HPLC-Analyse von Proben mit PMP gekoppelter Glucuronsäure und Glucose bei 245 nm. AU = Absorptionseinheiten.

Im folgenden wird aus Gründen der Übersichtlichkeit aber weiterhin der Begriff Glucuronolacton verwendet. Durch die Integration der Signale konnte für jedes Signal eine Fläche (in Absorptionseinheiten x ml) berechnet werden. Mit Hilfe von Eichreihen (s. Abb. 22 und Abb. 23) des derivatisierten Glucuronolactons und der Glucose wurde jeweils ein linearer Zusammenhang zwischen Signalfäche und Konzentration hergestellt. Mittels der HPLC-Analyse wurden so die Konzentration von Glucuronolacton und Glucose in den Proben gemessen.

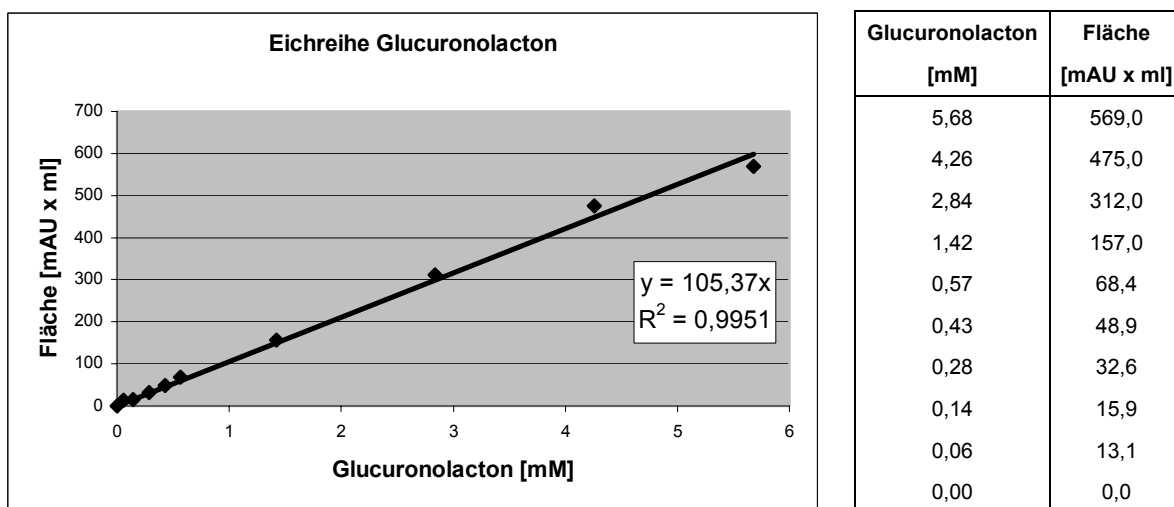


Abb. 22. Eichreihe von mit PMP modifiziertem Glucuronolacton in der RP-HPLC-Analyse. Angegeben sind außerdem die Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß (R^2). AU = Absorptionseinheiten.

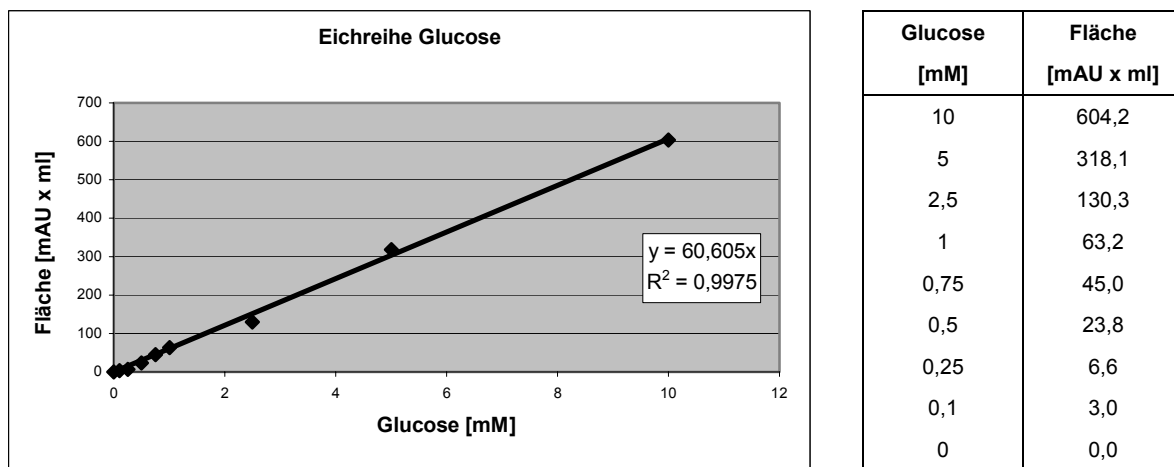


Abb. 23. Eichreihe von mit PMP modifizierter Glucose in der RP-HPLC-Analyse. Angegeben sind außerdem die Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß (R^2). AU = Absorptionseinheiten.

5.3.3.2 Zeitreihe des Glucuronolacton- und Glucosetransportes

Die Transportstudie von Glucuronolacton erfolgte im doppelten Ansatz über eine Zeitreihe von 0 - 120 min und einer Konzentration von 1 mg/ml im apikalen Kompartiment. Für jede Zeitreihe wurden jeweils 3 Transwellkavitäten verwendet, um zu jedem Zeitpunkt genügend Probenvolumen zur Verfügung zu haben. Die Messwerte der basolateral genommenen Proben sind in Tab. 17 zusammengefasst. Vor dem Beginn der Zeitreihe wurde in jedem Transwell der elektrische Widerstand der BMEC (TEER) gemessen, um die Funktionalität des Systems zu überprüfen. Ein TEER-Wert von über 600 Ωcm^2 entspricht einer dichten BMEC-Schicht und damit einem intakten Transwellssystem.

Tab. 17 Zeitreihe der basolateralen Glucuronolactonkonzentration im Transwellssystem.

TEER = transendothelialer elektrischer Widerstand, Konz. = Konzentration,

Volumen = basolaterales Volumen, AU = Absorptionseinheiten.

		1. Messreihe				2. Messreihe				Mittelwert
Zeit	Volumen	Trans-	TEER	Fläche	Konz.	Trans-	TEER	Fläche	Konz.	Konz.
[min]	[ml]	well	$[\Omega\text{cm}^2]$	[mAU*ml]	[mM]	well	$[\Omega\text{cm}^2]$	[mAU*ml]	[mM]	[mM]
5	1,5	1	1181	15,9	0,15	4	1560	0,6	0,01	0,08
10	1,4	1	1181	21,7	0,21	4	1560	7,6	0,07	0,14
15	1,3	1	1181	22,6	0,21	4	1560	13,5	0,13	0,17
20	1,2	1	1181	29	0,27	4	1560	31,5	0,3	0,29
30	1,5	2	1307	16,9	0,16	5	1468	12,3	0,12	0,14
40	1,4	2	1307	33,3	0,32	5	1468	28,9	0,27	0,30
50	1,3	2	1307	63,6	0,57	5	1468	40,9	0,39	0,48
60	1,2	2	1307	69,8	0,67	5	1468	65,4	0,62	0,65
75	1,5	3	1360	60,4	0,57	6	1357	48,7	0,46	0,52
90	1,4	3	1360	99,1	0,96	6	1357	65,1	0,62	0,79
120	1,3	3	1360	121,8	1,16	6	1357	120,6	1,13	1,15

Zur besseren Übersicht wurden die Messwerte in Abb. 24 graphisch dargestellt. Wie daraus ersichtlich ist, fand ein Transport des Glucuronolactons aus dem apikalen Kompartiment in das basolaterale statt. Glucuronolacton wird also *in vitro* über die BHS transportiert. Innerhalb des analysierten Zeitfensters verlief dieser Transport linear, d. h. ein Gleichgewicht zwischen apikalem und basolateralem Kompartiment stellte sich in diesem Zeitraum nicht ein. Nach zwei Stunden betrug die basolaterale Glucuronolactonkonzentration durchschnittlich 1,15 mM.

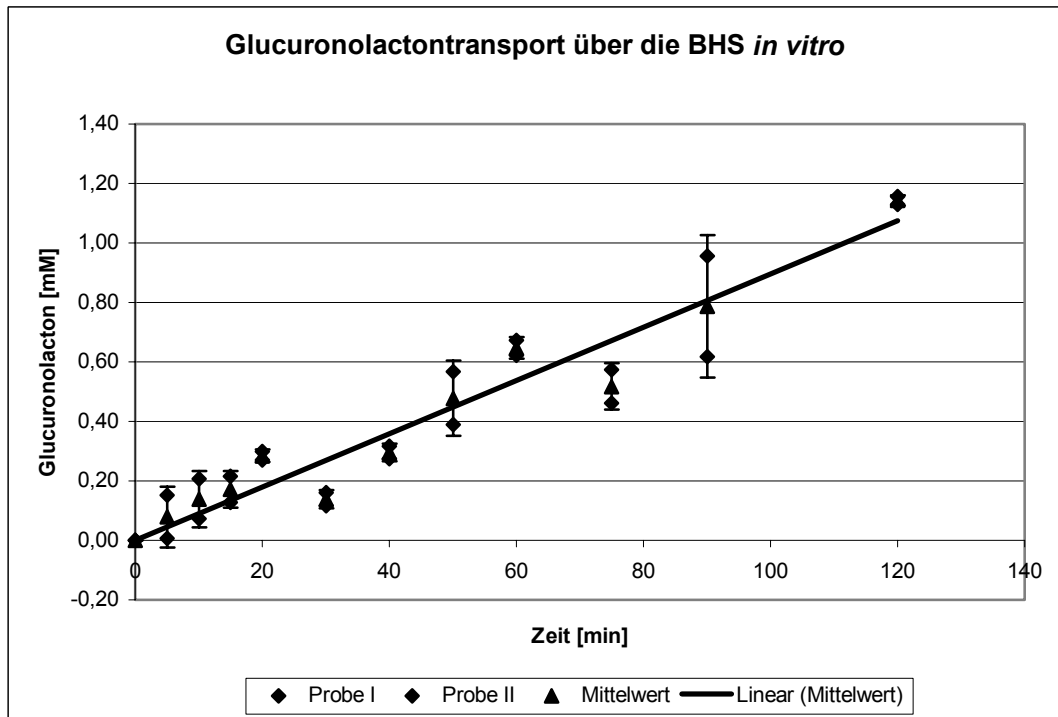


Abb. 24. Glucuronolactontransport im Transwellsystem über einen Zeitraum von 120 min. Dargestellt sind die einzelnen Werte jeder Zeitreihe (Probe I u. II) sowie die daraus gebildeten Mittelwerte.

Um die Ergebnisse besser einordnen zu können, wurden die Messungen analog mit Glucose (1 mg/ml apikal) durchgeführt. Da nicht bekannt war, ob Glucuronolacton den Transport von Glucose beeinflusst, wurden je zwei Zeitreihen für Glucose in An- und Abwesenheit von Glucuronolacton (1 mg/ml) aufgenommen. Die Messwerte sind in Tab. 18 zusammengefasst und in Abb. 25 graphisch dargestellt.

Tab. 18 Zeitreihe der basolateralen Glucosekonzentration im Transwellsystem.

TEER = trans endothelialer elektrischer Widerstand, Konz. = Konzentration,

Volumen = basolaterales Volumen, AU = Absorptionseinheiten.

A) in Anwesenheit von Glucuronolacton.

Zeit [min]	Volumen [ml]	Trans- well	TEER [Ωcm^2]	Fläche [mAu*ml]	Konz. [mM]	Trans- well	TEER [Ωcm^2]	Fläche [mAu*ml]	Konz. [mM]	Konz. [mM]
5	1,5	1	1181	7,1	0,12	4	1560	0,5	0,01	0,07
10	1,4	1	1181	9,9	0,16	4	1560	3,5	0,06	0,11
15	1,3	1	1181	10,4	0,17	4	1560	5,8	0,10	0,14
20	1,2	1	1181	13,3	0,22	4	1560	14,8	0,24	0,23
30	1,5	2	1307	8,4	0,14	5	1468	5,1	0,08	0,11
40	1,4	2	1307	14,6	0,24	5	1468	14,3	0,24	0,24
50	1,3	2	1307	29,8	0,47	5	1468	17,3	0,29	0,38
60	1,2	2	1307	31,1	0,52	5	1468	29,6	0,49	0,51
75	1,5	3	1360	30,4	0,50	6	1357	22,2	0,37	0,44
90	1,4	3	1360	47	0,80	6	1357	29,1	0,48	0,64
120	1,3	3	1360	56,9	0,94	6	1357	56,4	0,91	0,93

B) in Abwesenheit von Glucuronolacton.

Zeit [min]	Volumen [ml]	Trans- well	TEER [Ωcm^2]	Fläche [mAu*ml]	Konz. [mM]	Trans- well	TEER [Ωcm^2]	Fläche [mAu*ml]	Konz. [mM]	Konz. [mM]
5	1,5	7	932	0,5	0,01	10	1767	2,8	0,05	0,03
10	1,4	7	932	3,7	0,06	10	1767	3,7	0,06	0,06
15	1,3	7	932	7,8	0,13	10	1767	7,1	0,12	0,13
20	1,2	7	932	13,1	0,21	10	1767	67,9	1,12	0,67
30	1,5	8	1443	8,1	0,13	11	1366	10,7	0,18	0,16
40	1,4	8	1443	10,4	0,17	11	1366	12,5	0,21	0,19
50	1,3	8	1443	18,3	0,30	11	1366	21,9	0,36	0,33
60	1,2	8	1443	17,8	0,39	11	1366	30,1	0,50	0,45
75	1,5	9	1404	22,5	0,37	12	1104	12	0,20	0,29
90	1,4	9	1404	26,8	0,44	12	1104	26,7	0,44	0,44
120	1,3	9	1404	36,9	0,61	12	1104	49,9	0,81	0,71

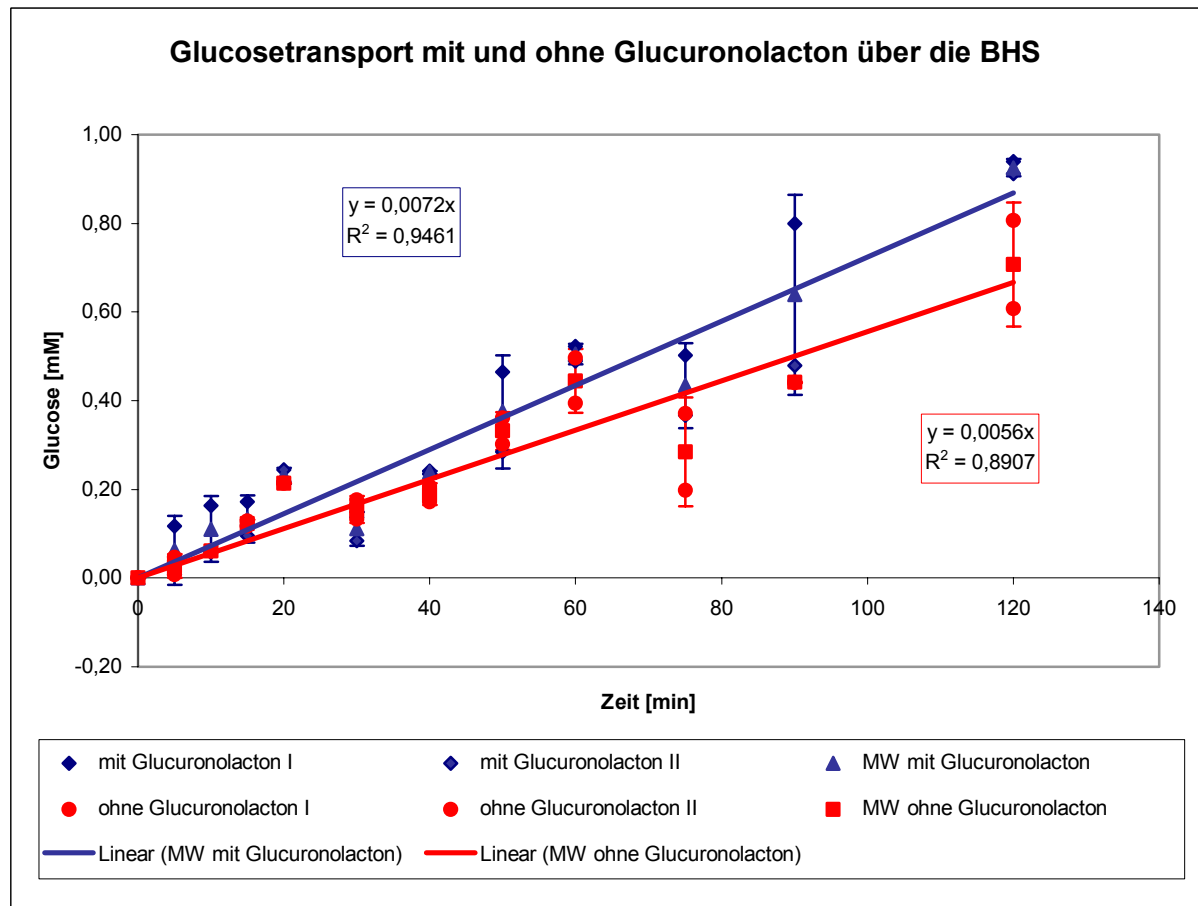


Abb. 25. Zeitreihe Glucosetransport mit (blau) und ohne (rot) Glucuronolacton. I u. II = Messreihe, MW = Mittelwert, R^2 = Bestimmtheitsmaß.

Der Glucosetransport verlief im untersuchten Zeitraum ebenfalls linear. Vergleicht man die Messwerte zweier verschiedener Transwellkavitäten zum selben Zeitpunkt, so traten teilweise hohe Abweichungen auf, wie z. B. bei der Transwellkavität Nr. 1 nach 90 min mit 0,8 mM und der Kavität Nr. 2 nach 90 min mit 0,48 mM. Diese hohen Schwankungen waren zwar nicht häufig, traten aber vermehrt bei den letzten Messpunkten auf. Dies erklärt auch die relativ niedrigen Werte des Bestimmtheitsmaßes (R^2) der beiden Messreihen (s. Abb. 25). Das Bestimmtheitsmaß gibt den Prozentsatz der Varianz an, der durch das lineare Modell erklärt wird. Es war deshalb nicht eindeutig festzustellen, ob die Unterschiede in der Steigung der Glucosewerte auf das Glucuronolacton oder auf die Messschwankungen zurückzuführen waren.

5.3.3.3 Glucosetransport über die BHS in Abhängigkeit von Glucuronolacton

In diesem Experiment wurde das Konzentrationsverhältnis zwischen apikalem (Donor-Kompartiment) und basolateralem (Akzeptor-Kompartiment) Glucuronolacton und apikaler sowie basolateraler Glucose nach 120 min Inkubation untersucht. Hierzu wurde Glucose

(1mg/ml) zusammen mit Glucuronolacton (1 mg/ml) apikal in je drei Transwellkavitäten eingesetzt. In einem weiteren Versuch wurde nur Glucose (1 mg/ml) apikal in drei Transwellkavitäten gegeben. Proben wurden jeweils nach 120 min genommen und mittels HPLC analysiert. Die Proben für die erste Messreihe (apikal und basolateral „a“) wurden mit PMP derivatisiert und innerhalb von 24 h analysiert. Die Proben für die zweite Messreihe (basolateral „b“) wurden bei +4 °C gelagert und nach drei Tagen derivatisiert und gemessen. In Tab. 19 sind die jeweiligen Messwerte dargestellt. Aus den Messwerten der einzelnen Proben wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet (s. Tab. 20).

Tab. 19 Messreihe: Glucuronolacton- und Glucosetransport nach 120 min in je 3 Transwells.
Doppelbestimmung der basolateralen Proben (a u. b).
TEER = transendothelialer elektrischer Widerstand, AU = Absorptionseinheiten.

A) Glucuronolacton und Glucose apikal

Probe	Trans- well	TEER [Ωcm^2]	Fläche [mAU x ml]		Konzentration [mM]	
			Glucuronolacton	Glucose	Glucuronolacton	Glucose
apikal	1	1148	365,4	160,3	3,47	2,65
apikal	2	795	439,7	168,7	4,17	2,78
apikal	3	871	379,9	152,7	3,61	2,52
basolateral a	1	1148	61,6	27,4	0,58	0,45
basolateral a	2	795	81,9	37,9	0,78	0,63
basolateral a	3	871	71,8	32,0	0,68	0,53
basolateral b	1	1148	36,3	5,9	0,34	0,10
basolateral b	2	795	37,9	11,8	0,36	0,19
basolateral b	3	871	31,1	8,0	0,30	0,13

B) nur Glucose apikal

Probe	Trans- well	TEER [Ωcm^2]	Fläche [mAU x ml]	Konzentration [mM]
			Glucose	Glucose
apikal	4	630	134,7	2,22
apikal	5	572	150,4	2,48
apikal	6	760	120,0	1,98
basolateral a	4	630	47,3	0,78
basolateral a	5	572	37,6	0,62
basolateral a	6	760	29,2	0,48
basolateral b	4	630	17,0	0,28
basolateral b	5	572	7,3	0,12
basolateral b	6	760	13,4	0,22

Tab. 20 Mittelwerte und Standardabweichungen (STABW) der Konzentrationswerte aus Tab. 19 A) und B)

	Probe	Mittelwert Glucuronolacton [mM]	STABW	Mittelwert	STABW
				Glucose [mM]	
Tab. 10 A)	apikal	3,75	0,37	2,65	0,13
	basolateral a	0,68	0,1	0,53	0,09
	basolateral b	0,33	0,03	0,14	0,05
	basolateral a&b	0,51	0,2	0,34	0,22
Tab. 10 B)	apikal	-	-	2,23	0,25
	basolateral a	-	-	0,63	0,15
	basolateral b	-	-	0,21	0,08
	basolateral a&b	-	-	0,42	0,25

Wie Abb. 26 verdeutlicht, wurde innerhalb der 120 min nur ein kleiner Teil des Glucuronolactons (Mittelwert 0,51 mM = 12 %) über das BHS-Modell transportiert. Im selben Zeitraum wurden ca. 11,4 % (0,34 mM) der Glucose in Anwesenheit und ca. 15,8 % (0,42 mM) in Abwesenheit von Glucuronolacton in das basolaterale Kompartiment transportiert (s. Abb. 27). Hierbei galt, die Summe aus der apikalen und der basolateralen Konzentration nach 120 min entspricht 100%.

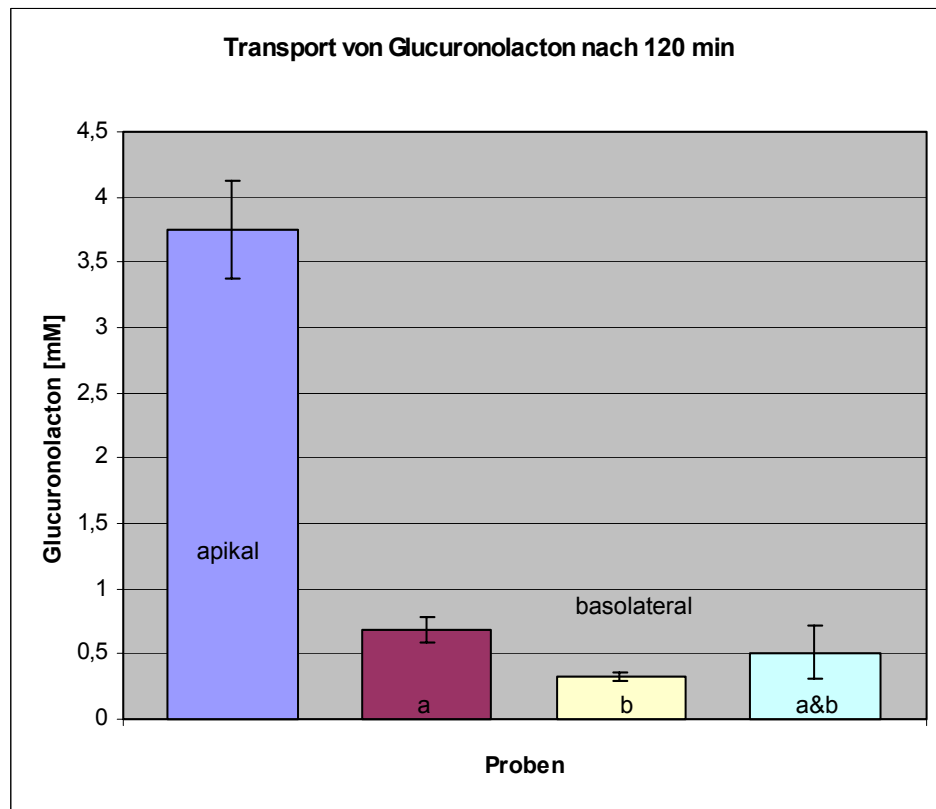


Abb. 26. Glucuronolactontransport nach 120 min. Dargestellt sind die Mittelwerte der apikalen und basolateralen Glucuronolactonkonzentrationen. Bei den basolateralen Werten sind die Mittelwerte der einzelnen Messreihen (a bzw. b) sowie der Mittelwert aller basolateralen Werte zusammen (a&b) angegeben.

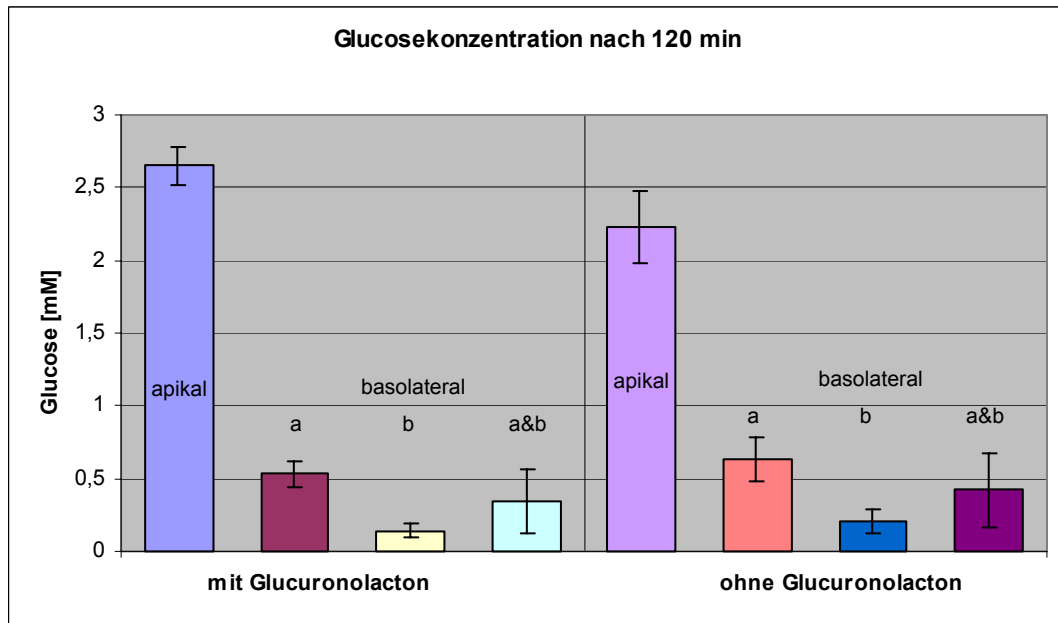


Abb. 27. Glucosetransport in An- und Abwesenheit von Glucuronolacton nach 120 min. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte der einzelnen Messreihen sowie der Mittelwert aller basolateralen Werte zusammen (a&b).

Im Zeitreihenexperiment (s. 5.3.3.2) lag nach 120 min die basolaterale Glucuronolactonkonzentration bei 1,15 mM und die basolaterale Glucosekonzentration zwischen 0,61 und 0,94 mM.

Die Messreihen zeigten untereinander (a vs. b) starke Messschwankungen (über 50 %). Die einzelnen Werte einer Reihe (a oder b) zeigten hingegen deutlich niedrigere Messschwankungen. Der Transport von Glucuronolacton scheint den Transport von Glucose zu vermindern. Dies konnte allerdings aufgrund der hohen Standardabweichung nicht eindeutig gezeigt werden.

Umgekehrt wurde auch der Glucuronolacton-Transport in Abhängigkeit von der Glucose nach 120 min Inkubation untersucht. Hierzu wurde in drei Transwellssystemen apikal 1 mg/ml Glucuronolacton geben, während sowohl apikal als auch basolateral je 1 mg/ml Glucose vorgelegt wurde. Dieser Ansatz wird im Weiteren auch mit GlcLA_{mit Glc} abgekürzt. Diese drei Transwellssysteme wurden mit den bereits oben beschriebenen verglichen, in denen apikal je 1 mg/ml Glucuronolacton und Glucose vorgelegt wurde und basolateral weder Glucuronolacton noch Glucose zugegeben wurde. Dieser Ansatz wird weiterhin auch als GlcLA_{ohne Glc} bezeichnet. Tab. 21 fasst die Daten dieser Messreihe zusammen, während in Tab. 22 die Mittelwerte und Standardabweichungen beider Messreihen für den Vergleich dargestellt sind.

Tab. 21 Messreihe: Glucuronolactontransport nach 120 min in 3 Transwells mit 1 mg/ml Glucuronolacton apikal und 1 mg/ml Glucose apikal und basolateral.

TEER = transendothelialer elektrischer Widerstand, AU = Absorptionseinheiten.

Probe	Trans- well	TEER [Ωcm^2]	Fläche [mAU x ml] Glucuronolacton	Konzentration [mM] Glucuronolacton
apikal	7	916	246,39	2,34
apikal	8	351	373,24	3,54
apikal	9	572	194,11	1,84
basolateral a	7	916	64,21	0,61
basolateral a	8	351	70,84	0,67
basolateral a	9	572	78,26	0,74
basolateral b	7	916	75,12	0,71
basolateral b	8	351	45,92	0,44
basolateral b	9	572	69,78	0,66

Tab. 22 Mittelwerte und Standardabweichungen (STABW) der Konzentrationswerte aus Tab. 21 sowie der Probe Glucuronolacton ohne Glucose basolateral „a&b“ aus Tab. 20

	Probe	Mittelwert	STABW
		Glucuronolacton [mM]	
Glucuronolacton – ohne Glucose basolateral (aus Tab. 20; GlcLA _{ohne Glc})	apikal	3,75	0,37
	basolateral a&b	0,51	0,2
Glucuronolacton – mit Glucose basolateral (aus Tab. 21; GlcLA _{mit Glc})	apikal	2,57	0,87
	basolateral a	0,67	0,07
	basolateral b	0,60	0,15
	basolateral a&b	0,64	0,05

Die Werte der Proben „a&b“ aus Tab. 22 sind in Abb. 28 dargestellt. Die Glucuronolactonkonzentration nach 120 min war basolateral etwas höher, wenn bereits Glucose in der basolateralen Kammer war. Gleichzeitig war die apikale Glucuronolactonkonzentration in der Messreihe GlcLA_{mit Glc} deutlich niedriger als in GlcLA_{ohne Glc}. Die Standardabweichung bei der apikalen Konzentration von Glucuronolacton aus GlcLA_{mit Glc} war mit 25 % sehr hoch. Der Unterschied in der basolateralen Glucuronolactonkonzentration zwischen den beiden Ansätzen wurde deutlicher, wenn nicht die einzelnen Konzentrationswerte betrachtet wurden, sondern jeweils das Verhältnis von apikaler zu basolateraler Konzentration (Abb. 29). Das Verhältnis wurde unter der Annahme berechnet, dass die Summe der apikalen und der basolateralen Konzentration nach 120 min 100 % entsprach. Demnach gelangten ca. 40

% weniger Glucuronolacton in die basolaterale Kammer, falls diese zu Testbeginn keine Glucose enthielt ($\text{GlcLA}_{\text{ohne Glc}}$).

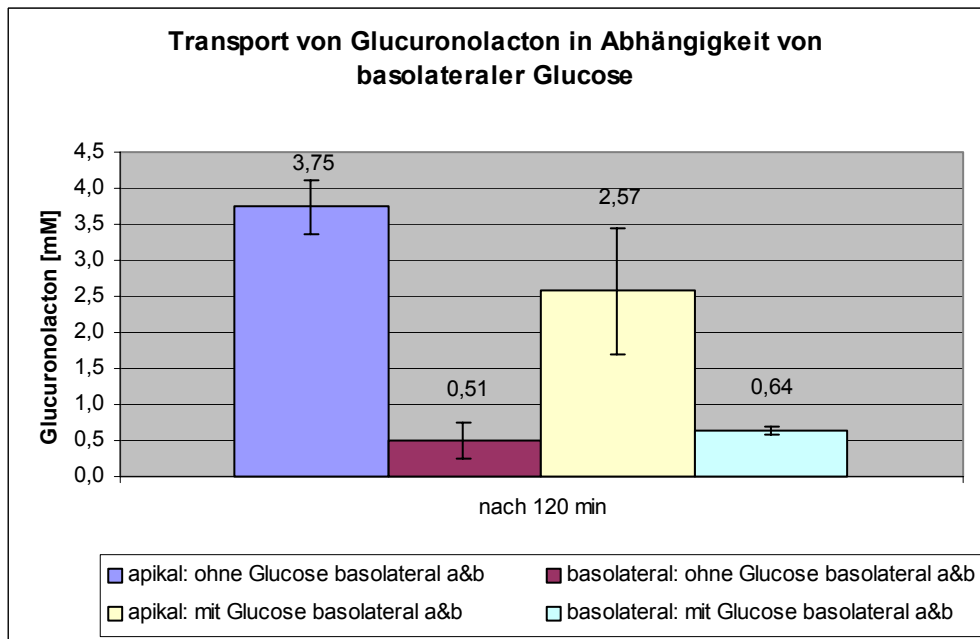


Abb. 28. Glucuronolactontransport in Abhängigkeit von Glucose nach 120 min. Dargestellt sind die Mittelwerte der apikalen und basolateralen Glucuronolactonkonzentrationen „a&b“ sowie die Standardabweichung.

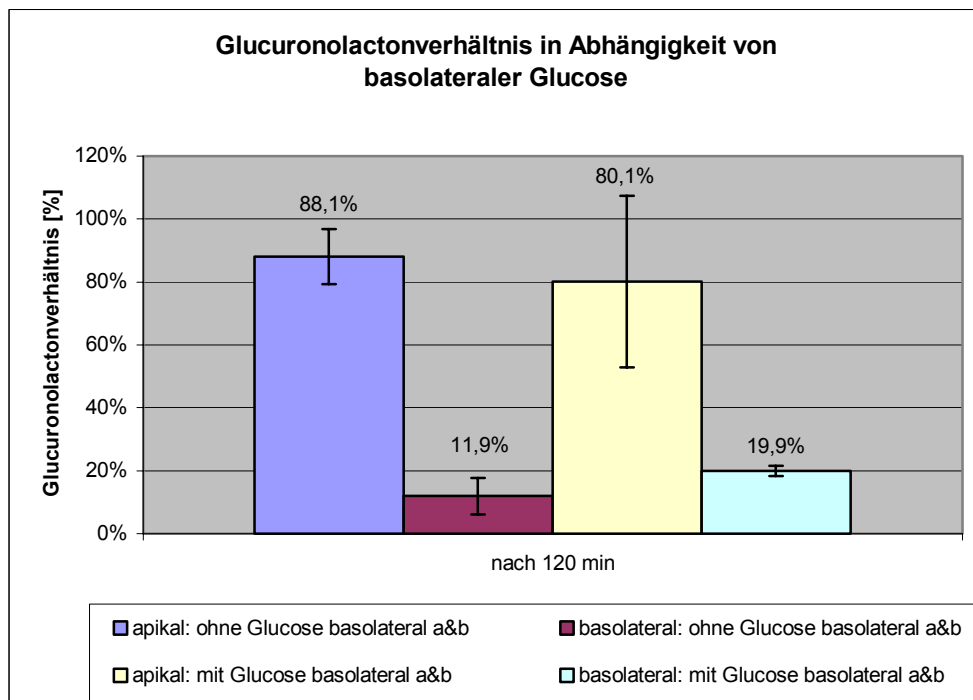


Abb. 29. Verhältnis von Glucuronolacton in Abhängigkeit von Glucose nach 120 min in Prozent. Gezeigt sind jeweils die Verhältnisse der Mittelwerte der Proben „a&b“ sowie die Standardabweichung.

Aus dem Verhältnis zwischen apikaler und basolateraler Stoffmenge lässt sich durch die von Franke et al. (2000) beschriebene Methode der Permeabilitätskoeffizient (P) einer Substanz berechnen. Diese Darstellung der Permeabilität hat sich in der Literatur durchgesetzt und ermöglicht eine einheitliche und vergleichbare Angabe von Daten aus Transportstudien. Die Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten beginnt mit der Multiplikation des Anteils der Substanz (X), die zu einem gegebenen Zeitpunkt vom Donor- in das Akzeptor-Kompartiment transferiert wurde, mit dem Volumen der Donorkammer (V_D , hier 0,5 ml). Dies ergibt den sogenannten „zunehmenden Totraum“ (ΔCI [cm^3]; 1). X war in dieser Arbeit der Quotient aus der apikalen Konzentration zum Zeitpunkt $t = 0$ und der basolateralen Konzentration zum Zeitpunkt $t = 120$ min.

$$\Delta CI = X * V_D \quad (1)$$

Der Quotient aus zunehmenden Totraum und der Zeit (Δt , hier 7200 s) führt zum Permeabilitäts-Oberflächenprodukt (PS [cm^3/s]; 2).

$$\Delta CI / \Delta t = PS \quad (2)$$

Um den Permeabilitätskoeffizient (P) zu erhalten muss anschließend das Permeabilitäts-Oberflächenprodukt durch die Filterfläche (S , in diesen Transwellsystem 1,1 cm^2) geteilt werden (3). Daraus resultiert die Einheit des Permeabilitätskoeffizienten in cm / s .

$$PS / S = P \quad (3)$$

Zur Bestimmung der zellspezifischen und damit filterunabhängigen Permeabilitätskoeffizient (P_e) muss der Permeabilitätskoeffizient (P_t) noch um den Permeabilitätskoeffizienten des zellfreien Transwellsystems (P_f) korrigiert werden (4).

$$1 / P_e = 1 / P_t - 1 / P_f \quad (4)$$

Die Permeabilität im zellfreien System P_f betrug für Glucuronolacton $1,389 \times 10^{-5}$ und für Glucose $1,495 \times 10^{-5}$. Zur besseren Übersicht wird der endotheliale Permeabilitätskoeffizient P_e nicht in cm / s , sondern in $10^{-6} \text{ cm} / \text{s}$ dargestellt.

In Tab. 23 sind die Permeabilitätskoeffizienten für die Mittelwerte „a&b“ von Glucuronolacton und Glucose dargestellt (Mittelwerte „a&b“ s. Tab. 20 und Tab. 22).

Tab. 23 Endothelialer Permeabilitätskoeffizient (P_e) der Proben a&b von 1. Glucose mit apikalem Glucuronolacton, 2. Glucose ohne apikalem Glucuronolacton, 3. Glucuronolacton mit apikaler Glucose und 4. Glucuronolacton mit apikaler und basolateraler Glucose.

STABW = Standardabweichung.

Probe a&b	Verhältnis apikal zu basolateral	P_e [cm / s]	$P_e \times 10^{-6}$ [cm / s]	STABW $P_e \times 10^{-6}$ [cm / s]
Glucose - mit Glucuronolacton apikal	0,089	9,061E-06	9,06	+/- 4,83
Glucose - ohne Glucuronolacton apikal	0,110	1,306E-05	13,06	+/- 5,74
Glucuronolacton - mit Glucose apikal	0,102	1,2E-05	12,01	+/- 3,09
Glucuronolacton - mit Glucose apikal und basolateral	0,128	1,93E-05	19,30	+/- 1,578

Demnach war die BHS *in vitro* für Glucose ($13,06 P_e \times 10^{-6}$) ähnlich permeabel wie für Glucuronolacton ($12,01 P_e \times 10^{-6}$). Die Permeabilität von Glucose nahm in Anwesenheit von Glucuronolacton um ca. 30 % ab ($9,06 P_e \times 10^{-6}$). Allerdings sei hier auf die hohe Standardabweichung hingewiesen. Die Permeabilität von Glucuronolacton war ohne Glucose in der basolateralen Kammer um ca. 38 % niedriger ($12,01 P_e \times 10^{-6}$), als wenn bereits zu Testbeginn basolateral und apikal die gleiche Glucosekonzentration vorlag ($19,30 P_e \times 10^{-6}$).

5.4 Wirkung von Glucuronolacton, Koffein und Taurin auf Schweinehirnendothelzellen (BMEC)

In 5.2 wurde die Wirkung von Glucuronolacton auf die Proteinexpression in Rattenhepatozyten untersucht. Ziel des folgenden Experimentes war es, nachzuweisen, ob die „aktiven“ Inhaltsstoffe (Glucuronolacton, Koffein und Taurin) eines *Energy Drinks* die Proteinexpression in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke verändern. Die Endothelzellen sind der Hauptbestandteil der Schrankenfunktion, und somit Primärziel für Untersuchungen an der BHS. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte wie bei den Hepatozyten auch durch 2D-Gel-Analysen. Die aus frisch isolierten BMEC gewonnenen Kulturen wurden mittels Immunfärbungen auf die Bildung der für cerebrales Endothel spezifischen Markerproteine ZO-1, Glut-1 und vWF sowie auf die Bildung des in diesen Zellen fehlende glatte Muskel-Aktin überprüft. So wurde sichergestellt, dass auch tatsächlich Endothelzellen isoliert und kultiviert wurden.

5.4.1 Vitalitätstest

Für die BMEC wurde, wie auch für die Hepatozyten, ein Vitalitätstest mittels Fluoresceindiacetat durchgeführt (s. 4.7.6). In Abb. 30 ist die Vitalität der Endothelzellkulturen in Abhängigkeit von der Glucuronolactonkonzentration dargestellt. Ab einer Konzentration

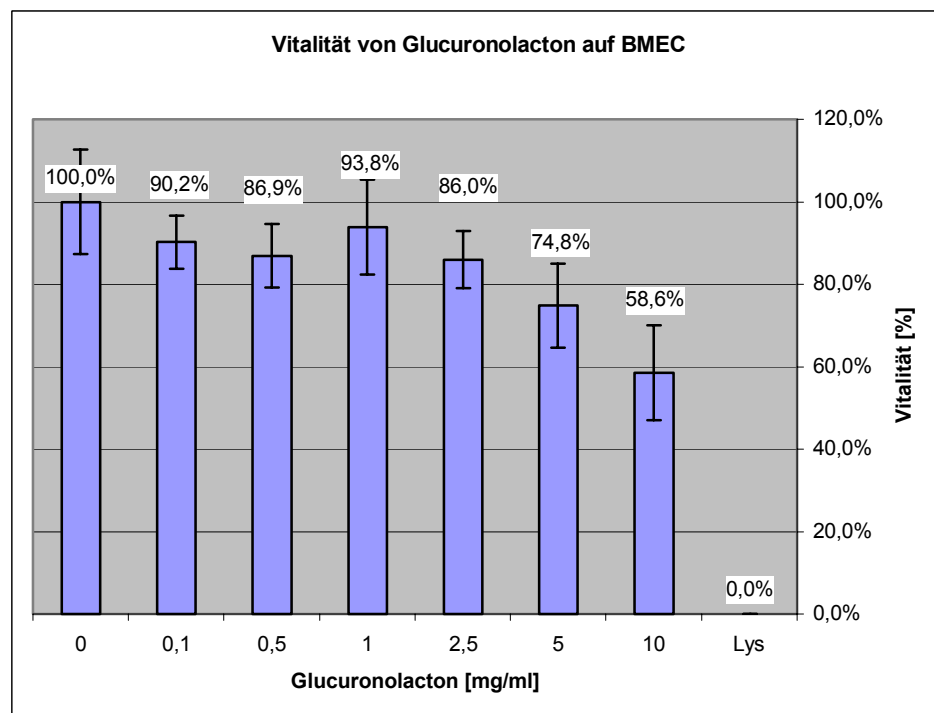


Abb. 30. Vitalität von BMEC in Abhängigkeit von unterschiedlichen Glucuronolactonkonzentrationen nach 6,75 h Inkubation. Lys = lysierte Zellen als Kontrolle.

von 5 mg/ml wurde eine Vitalitätsminderung festgestellt. Die Vitalität sank hier von 100 % auf ca. 75 %, bei 10 mg/ml nahm sie fast um die Hälfte ab, während bis zu einer Konzentration von 1 mg/ml kein vitalitätsmindernder Effekt gegenüber der Kontrollkultur beobachtet wurde. Bei einer Konzentration von bis zu 1 mg/ml konnte also ausgeschlossen werden, dass Änderungen in der Proteinexpression aus toxischen Effekten resultierten.

5.4.2 Kultivierung und Zellaufschluss der BMEC

Konfluente BMEC-Primärkulturen wurden in drei Ansätzen mit 1 mg/ml Glucuronolacton, 0,133 mg/ml Koffein oder 1,66 mg/ml Taurin für zwei Stunden inkubiert. Die Glucuronolactonkonzentration wurde wie in den Transwellversuchen mit 1 mg/ml festgelegt. Koffein und Taurin wurden in dem gleichen Verhältnis zum Glucuronolacton eingesetzt, das auch in den *Energy Drinks* vorliegt. Der vierte Ansatz ohne Substanzzugaben diente als Kontrolle. Nach der Inkubation wurden die Zellen aufgeschlossen und die Proteine isoliert. Diesmal wurden insgesamt vier Ansätze untersucht. Von jedem Ansatz wurde anstelle eines DDF-Aufschlusses ein Gesamtzellaufschluss hergestellt. Tab. 24 gibt einen Überblick über die jeweils isolierte Proteinmenge.

Tab. 24 Isolierte Proteinmenge aus den 4 Ansätzen (Glucuronolacton, Taurin, Koffein, Kontrolle)

Probe	Proteinausbeute	
	[mg/ml]	[mg]
Glucuronolacton	1,50	0,60
Taurin	0,48	0,19
Koffein	0,33	0,13
Kontrolle	0,61	0,25

5.4.3 2D-Gelanalysen der BMEC

Wie bei den Hepatozyten wurde für die BMEC zuerst ein 2D-Gel mit einem pH-Bereich von pH 3 - 10 angefertigt. Analog zu den „Mini-Gelen“ der Hepatozyten war auch bei den BMEC der größte Proteinanteil in einem pH-Bereich von pH 4 - 7,5 zu finden. Von jedem Ansatz wurden deshalb vier 2D-Gele mit einem pH-Gradienten von pH 4 - 7 über 18 cm angefertigt. Die Proteinmenge pro Gel betrug 50 µg. Die Gele wurden eingescannt und mit Hilfe der Software PDQuest™ 7.0 analysiert. Abb. 31 bis Abb. 34 zeigen je ein 2D-Gel des jeweiligen Gesamtaufschlusses der BMEC-Kulturen, die mit Glucuronolacton, Koffein oder Taurin inkubiert wurden bzw. der Kontrollkultur.

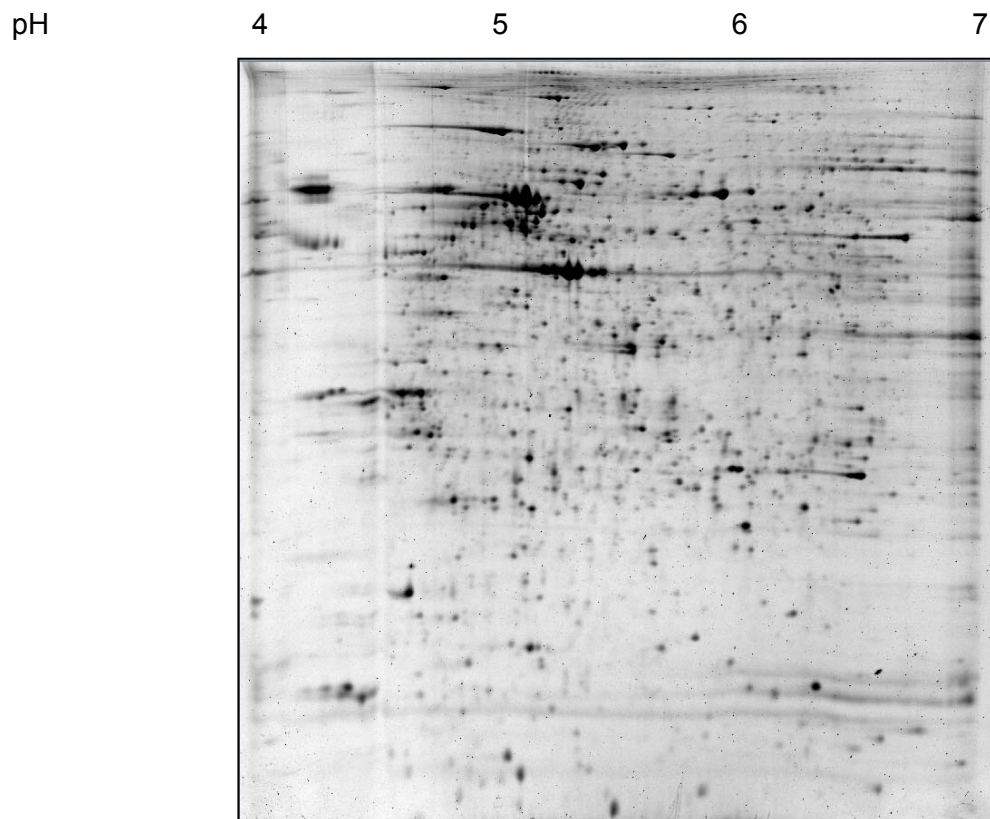


Abb. 31. Sypro Ruby™ gefärbtes 2D-Gel aus dem Gesamtaufschluss der BMEC-Kontrollkultur.

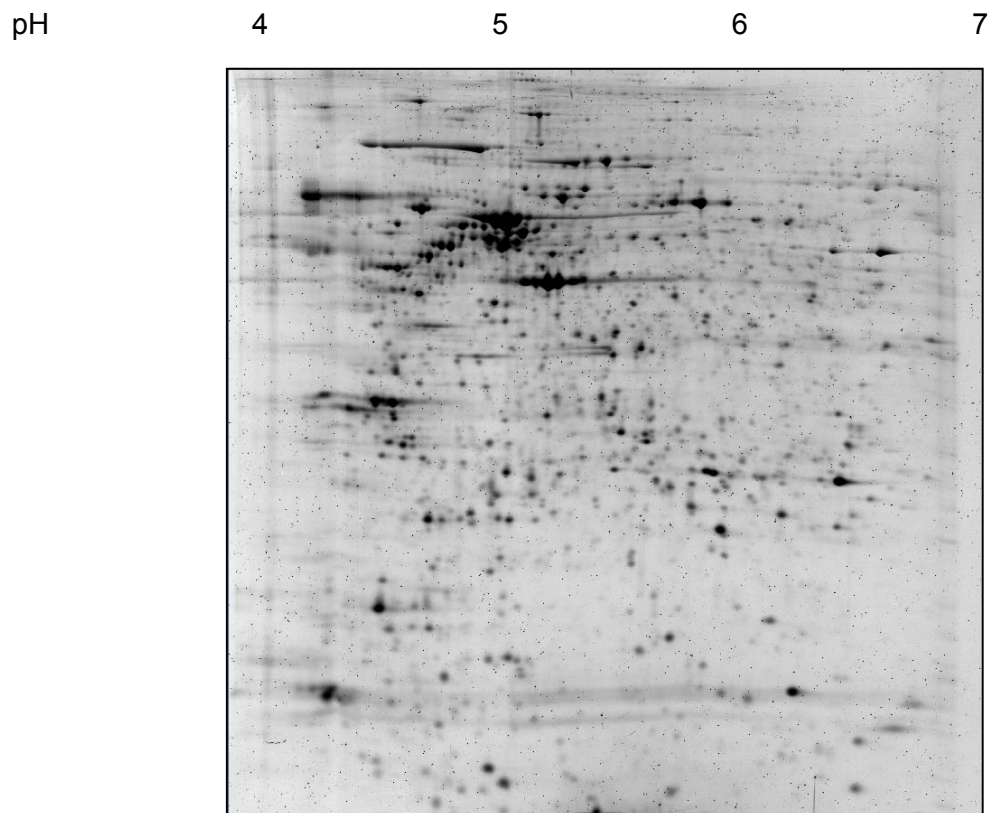


Abb. 32. Sypro Ruby™ gefärbtes 2D-Gel aus dem Gesamtaufschluss der BMEC-Kulturen, die mit Glucuronolacton inkubiert wurden.

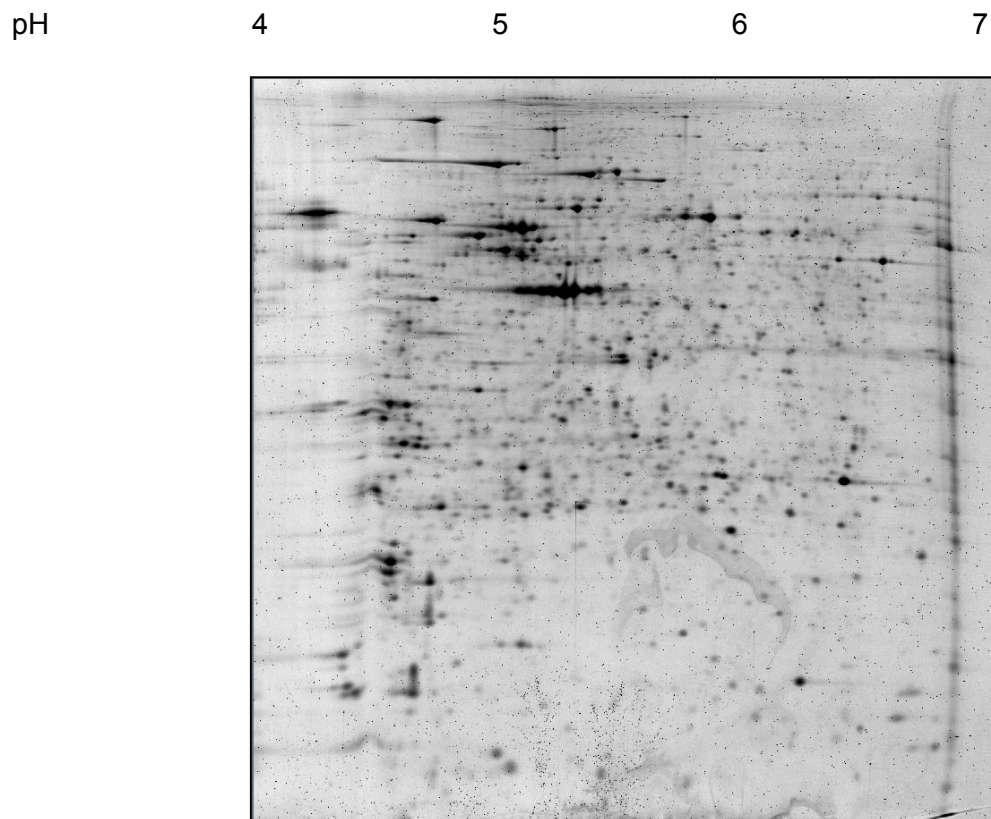


Abb. 33. Sypro Ruby™ gefärbtes 2D-Gel aus dem Gesamtaufschluss der BMEC-Kulturen, die mit Koffein inkubiert wurden.

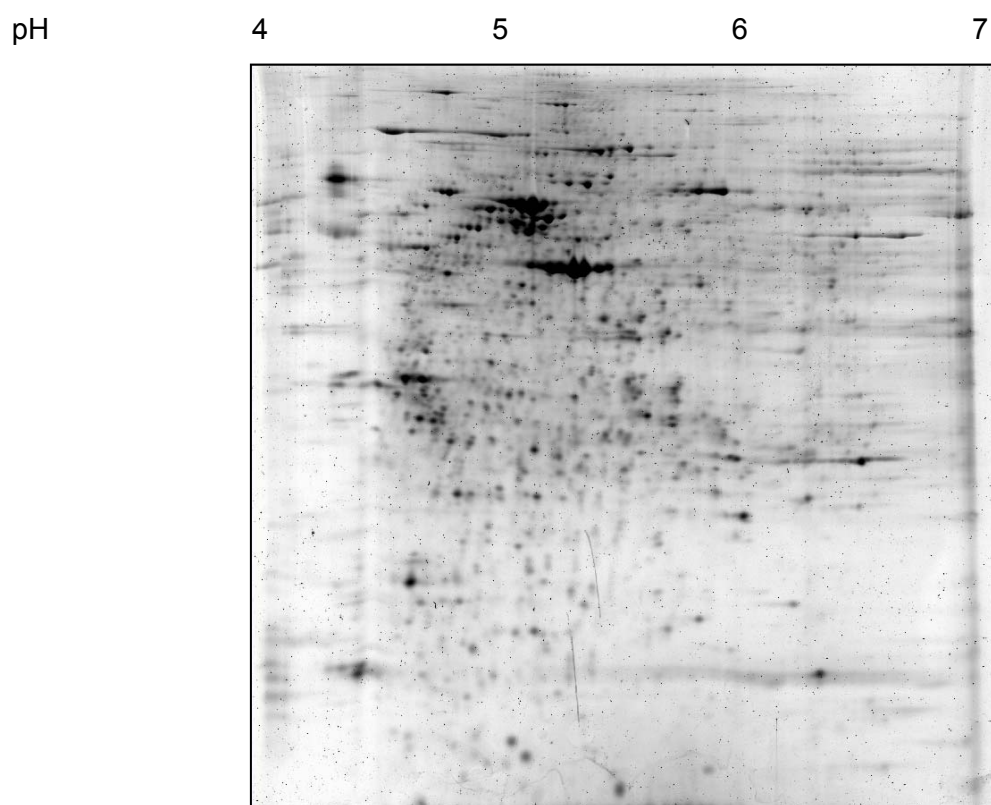
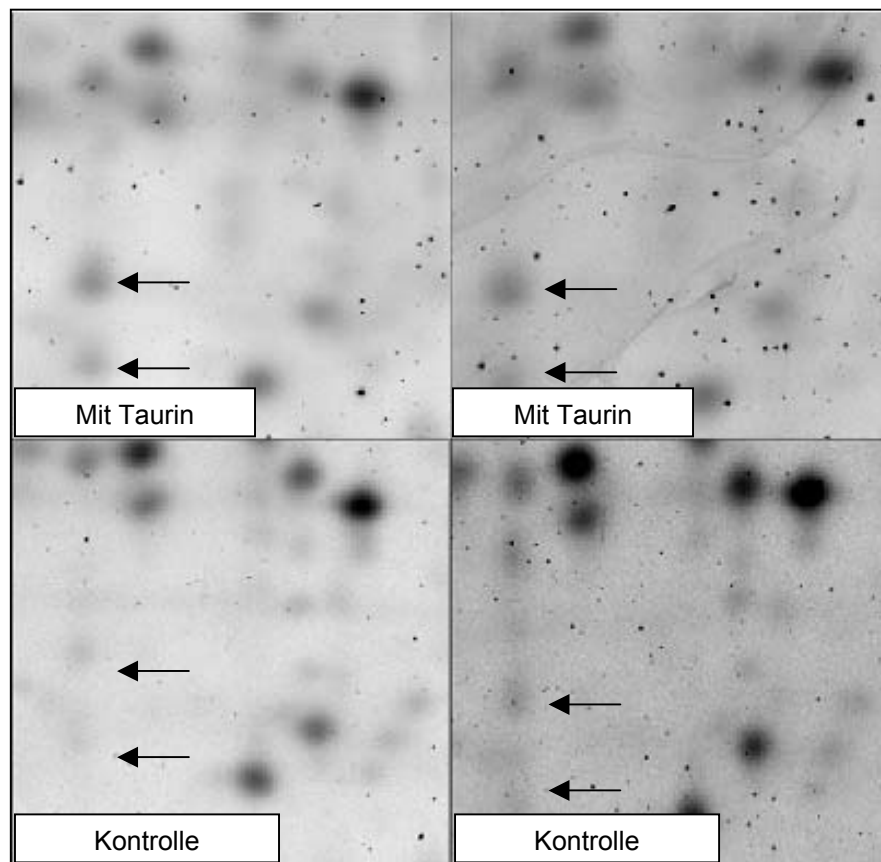


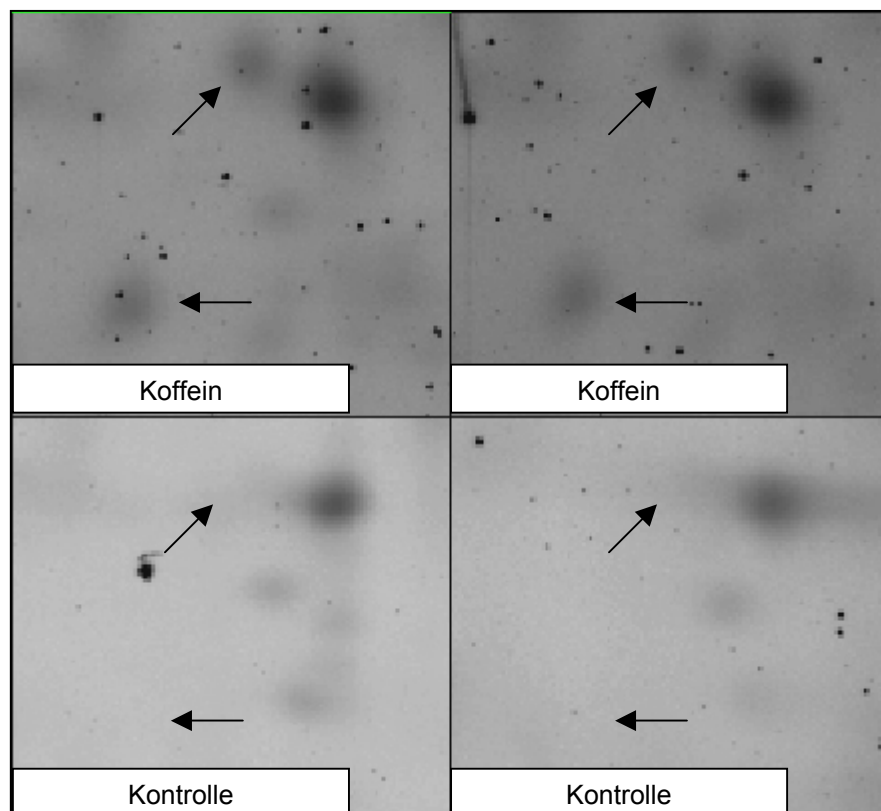
Abb. 34. Sypro Ruby™ gefärbtes 2D-Gel aus dem Gesamtaufschluss der BMEC-Kulturen, die mit Taurin inkubiert wurden.

Abb. 35 zeigt exemplarisch aus jedem 2D-Gelvergleich einer Substanz mit der Kontrolle einen Gelausschnitt, in dem differentielle Spots durch Pfeile markiert wurden.

A)



B)



C)

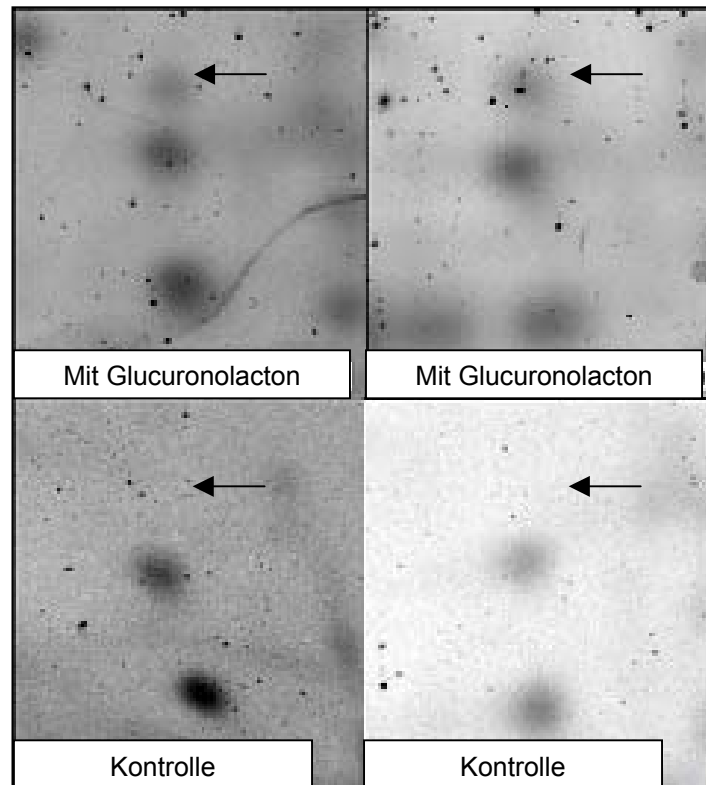


Abb. 35. Ausschnitte aus der 2D-Gelanalyse der Endothelzellen. Jede Vierergruppe zeigt in der unteren Hälfte zwei Gelausschnitte der Kontrolle. Die beiden oberen repräsentieren jeweils die substanzspezifischen Gele mit A) Taurin, B) Koffein und C) Glucuronolacton. Pfeile markieren die im jeweiligen Ausschnitt als differentiell gewerteten Spots.

Die Art und Anzahl der als differentiell eingestuften Spots sind in Tab. 25 dargestellt.

Tab. 25 Übersicht über die als differentiell im Vergleich zur Kontrolle bewerteten Spots. „Einzig“ bedeutet, dass der Spot nur in der entsprechenden Gruppe, nicht aber in der Kontrolle auftaucht. „Höher“ heißt, der Spot war in der angegeben Gruppe x mal intensiver als in der Kontrolle.

		Aufteilung "gesamt"		Aufteilung "höher"	
Kontrolle vs	gesamt	einzig	höher	5x	3 - 5x
Glucuronolacton	26	6	20	4	16
Taurin	32	16	16	5	11
Koffein	41	20	21	8	13

Die Zahl der differentiellen Spots lag bei den einzelnen Substanzen mit 33 für Glucuronolacton, 32 für Taurin und 41 für Koffein in derselben Größenordnung. Allerdings wurden für Taurin und Koffein mehr als doppelt so viele Spots der Kategorie „einzig“ beobachtet als für Glucuronolacton. Die Inkubation der BMEC mit einer dieser drei Substanzen, führte also in jedem Fall zu einer Veränderung des Proteinmusters der Zellen.

6 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Substanzen Glucuronolacton, Koffein und Taurin untersucht, die zu den „aktiven“ Inhaltsstoffen von *Energy Drinks* zählen. Insbesondere das Glucuronolacton stand dabei im Vordergrund. Diese Substanzen sollen positive kognitive und entgiftungsfördernde Wirkungen haben. Entgiftungsprozesse spielen sowohl in der Leber als auch in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (BHS) eine Rolle. Ferner müssen die Stoffe erst mit der BHS interagieren, bevor sie in das Gehirn gelangen können. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Wirkung dieser Substanzen auf das cerebrale Endothel und im Falle des Glucuronolactons auch auf Hepatozyten untersucht. Zusätzlich wurde der Transport in das Gehirn analysiert.

Zuerst wurde der Frage nachgegangen, ob das Glucuronolacton in den Experimenten als Lacton vorliegt oder zum Teil auch zur Glucuronsäure hydrolysiert wurde. Glucuronolacton wurde nicht nur in Wasser untersucht, sondern auch unter Testbedingungen in Medium gelöst. Die spezifische Rotation durch eine 8 %ige (w/v) Glucuronolactonlösung lag, über 24 Stunden gemessen, nahe bei dem für das Lacton, erwarteten Wertes von $18,5^\circ$ ($\pm 1,4^\circ$). Im selben Zeitraum konnte die spezifische Rotation durch Säurekatalyse des Glucuronolactons in Richtung der Glucuronsäure verschoben werden, lag aber immer noch auf der Seite des Lactons. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das Gleichgewicht auf der Seite des Lactons liegt, was jedoch im Widerspruch zu der Beobachtung steht, dass der pH-Wert in einer frisch angesetzten Glucuronolactonlösung innerhalb von vier Stunden um mehr als zwei pH-Einheiten fällt. Auch nach Marsh (1986) liegt das Gleichgewicht bei pH 7 auf der Seite der Glucuronsäure. Ein Gleichgewicht zwischen Glucuronolacton und Glucuronsäure wurde zwar angenommen, aber es wurde nicht eindeutig geklärt, wie es sich unter den Versuchsbedingungen eingestellt hatte. Da jedoch im Zellkulturmedium, vor allem in Anwesenheit von Zellen, keine bzw. nur eine geringfügige Abnahme des pH-Wertes festgestellt wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass von Glucuronolacton verursachte Effekte in der Proteomanalyse nicht auf Ansäuerung des Kulturmediums oder des Puffers zurückzuführen waren.

Die Proteomanalyse hat gegenüber dem Vergleich auf mRNA-Ebene den Vorteil, dass der tatsächliche Expressionszustand untersucht werden kann. Durch die zweidimensionale Gelelektrophorese lassen sich Unterschiede in den Zellen direkt auf Proteinebene beobachten. Der Weg von der mRNA zum funktionellen Protein ist sehr komplex und daher kann nicht immer vom mRNA-Spiegel auf das Vorhandensein und die Konzentration von Proteinen geschlossen werden. So würden z. B. Modifikationen in der Synthese von Proteinen, die auf Translationsebene kontrolliert oder die durch posttranslationale Modifikationen reguliert werden, durch mRNA-Analysen nicht entdeckt werden.

Die Unterschiede in der Proteinexpression zwischen einer mit Glucuronolacton behandelten und einer unbehandelten Zellkultur sollten möglichst substanzspezifisch sein und nicht durch unspezifische, toxische Effekte verursacht werden. Deshalb wurde vor den Versuchen ein Toxizitätstest mit Glucuronolacton durchgeführt und die Veränderung des pH-Wertes gemessen. Die Toxizitätsgrenze lag mit 2,5 mg/ml über der maximal verwendeten Konzentration von 1 mg/ml. Somit wurde ausgeschlossen, dass die beobachteten Unterschiede durch vitalitätsmindernde Effekte - verursacht durch toxische Substanzen - hervorgerufen wurden. Allerdings wurde der pH-Wert durch Glucuronolacton unter Testbedingungen ab einer Konzentration von 1 mg/ml leicht um 0,18 pH-Einheiten gesenkt. Änderungen dieser Größenordnung sind in Zellkulturen zwar nicht unüblich, was jedoch nicht bedeutet, dass dadurch keine geringfügigen Veränderung im Proteinmuster der Zellen verursacht werden könnten.

Bei den in Zellkultur verwendeten Hirnkapillarendothelzellen aus Ratten wurden bei einer Taurinkonzentration von 50 mM keine toxischen Effekte beobachtet (Kang et al., 2002). Für die Auswirkung von Koffein auf die Zellkultur gibt es widersprüchliche Angaben bezüglich der Cytotoxizität, die aber auf unterschiedlichen Konzentrationen und unterschiedliche Versuchsdauern beruhen. In einer Studie von Fernández et al. (2003) konnte in CHO-K1-Zellen (*chinese hamster ovary cells*) gezeigt werden, dass eine Koffeinkonzentration bis 5 mM nicht toxisch wirkt, während ab einer Konzentration von 10 mM Apoptose induziert wurde. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen von Jafari und Rabbani (2000), die in Makrophagen aus Ratte vergleichbare Konzentrationsabhängigkeiten festgestellt haben.

Die in dieser Arbeit verwendete Konzentration von 13,3 mM für Taurin liegt somit deutlich unter der bereits ohne negative Auswirkungen eingesetzten Konzentration von 50 mM. Auch die hier untersuchte Koffeinkonzentration von 0,69 mM ist signifikant niedriger als die in der Literatur beschriebene cytotoxische Konzentration. Deshalb wurde keine vitalitätsmindernde Wirkung der hier verwendeten Konzentrationen erwartet.

Die Inkubationszeit und Konzentration, mit der die Rattenhepatozyten mit Glucuronolacton inkubiert wurden, war auf vier Stunden und 0,1 mg/ml festgelegt worden. Mit dieser Schätzung sollte die Inkubationszeit und Konzentration möglichst nahe an den physiologischen Werten nach dem Konsum von ein bis zwei Dosen (0,25 - 0,5 l) eines *Energy Drinks* liegen. Dem liegt die Annahme zu Grunde, dass das gesamte Glucuronolacton einer Dose (600 mg) vollständig resorbiert wird, sich auf 6 Liter Blut verteilt und von dort aus dann in die Leber gelangen kann. Höchstwahrscheinlich werden *in vivo* weder 100 % resorbiert, noch wird sich die Verteilung auf den Blutkreislauf beschränken, wodurch die Konzentration nach unten korrigiert werden müsste. Auf der anderen Seite wurde nur der Konsum einer Dose berücksichtigt und mit sechs Litern Blut auch ein überdurchschnittlicher Wert gewählt. Um genauere Werte zu bekommen, wären weitere

Experimente, wie z. B. die Bestimmung der Glucuronolactonkonzentration im Blut oder in der Leber nach und vor dem Konsum eines *Energy Drinks* notwendig.

Für die Schweinehirnendothelzellen wurden Inkubationszeit und Glucuronolactonkonzentration auf 1 mg/ml und zwei Stunden festgelegt. Der Unterschied zu den Hepatozyten wurde bewusst gewählt, um die Parameter mit der Inkubationszeit und der Konzentration in den Transportstudien abzustimmen, in denen ebenfalls Schweinehirnendothelzellen eingesetzt wurden. Die niedrige Glucuronolactonkonzentration, wie sie im Hepatozytenversuch verwendet wurde, hätte unter der Nachweisgrenze der HPLC-Analyse aus den Transportstudien gelegen. Die Konzentrationen von Taurin (1,66 mg/ml) und Koffein (0,133 mg/ml) bei der die Hirnkapillarendothelzellen inkubiert wurden, wurde entsprechend ihrem Konzentrationsverhältnis zum Glucuronolacton in den *Energy Drinks* gewählt. Von diesen Konzentrationen wurden keine toxischen Effekte erwartet (s. o.).

Für den Zellaufschluss wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewandt. Die Hepatozyten wurden mittels der differentiellen Detergenz Fraktionierung (DDF) aufgeschlossen, während die Endothelzellen einem Gesamtaufschluss unterzogen wurden.

Die 2D-Gelanalyse ist zwar eine Methode, um gute und reproduzierbare Proteomanalysen durchzuführen, jedoch ist die Auflösung der 2D-PAGE durch die Komplexität des Proteoms begrenzt. Deutliche Unterschiede in den biochemischen Eigenschaften der verschiedenen Proteine resultieren in differentiellen Löslichkeiten in Detergenzien. Dies führt dazu, dass der Teil eines Proteoms, der im verwendeten Detergenz die beste Löslichkeit besitzt, auch derjenige ist, der in der 2D-Gelanalyse am besten aufgelöst wird. Proteine, die sich hingegen nur schlecht im eingesetzten Detergenz lösen, werden deswegen oft in der Proteomanalyse nicht berücksichtigt. Zur Charakterisierung von Membranproteinen, zu denen auch die für die Blut-Hirn-Schranke essentiellen Transporter gehören, werden deshalb auch gezielt Methoden gesucht bzw. optimiert, um speziell diese Membranproteine anreichern und identifizieren zu können (Märten, 2004; Oppolzer, 2004; Raab, 2003). Zur besseren Auflösung eines größeren Teils des gesamten Proteoms wurde die differentielle Fraktionierung entwickelt. In der hier verwendeten Methode nach Ramsby und Makowski (1999) werden durch den Einsatz verschiedener Detergenzien Proteine aus unterschiedlichen Zellkompartimenten (Cytosol, Membran, Kern und Cytoskelett) in vier Fraktionen angereichert. Jede Fraktion wurde anschließend durch 2D-Gelanalysen untersucht. Die gezielte Anreicherung verschiedener Fraktionen bringt zwar den Vorteil der besseren Auflösung vervierfacht, aber gleichzeitig den Aufwand der gesamten Analyse und setzt trotz einfacher und reproduzierbarer Anwendung eine größere Probenausgangsmenge voraus. Im Falle der Hepatozyten wurde der DDF-Aufschluss zur Proteomanalyse gewählt, da es nur einen Vergleich gab. Dagegen wurde für die Endothelzellen, bei denen insgesamt drei

verschiedene Zustände untersucht wurden, ein Gesamtaufschluss zur Proteinisolierung verwendet. Die Proteine, die im Gesamtaufschluss analysiert werden, entsprechen nach Erfahrungswerten unseres Labors, hauptsächlich den Proteinen der 1. Fraktion des DDF-Aufschlusses und damit den cytosolischen Proteinen.

Die zweidimensionale Proteomanalyse trennt die Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt und in der zweiten Dimension nach ihrer molekularen Masse. Durch die Wahl eines engen pH-Gradienten erhält man eine optimale Auflösung der Proteine in der ersten Dimension. Die hohe Auflösung geht allerdings einher mit hohen Verlusten an Proteinen und damit an Probenmaterial. Die hohen Verluste entstehen dadurch, dass die Proteinproben vollständig aufgetragen werden. Somit präzipitieren die Proteine, deren isoelektrische Punkte außerhalb des verwendeten pH-Gradienten liegen an den Elektroden und gehen verloren. Zur vollständigen Analyse eines Proteoms mit engen pH-Gradienten wird also eine große Menge Probenmaterial benötigt. Da die Probenmenge in dieser Arbeit ein limitierender Faktor war, wurde durch Vorversuche mit sogenannten „Mini-Gelen“ analysiert, in welchem pH-Bereich die höchste Proteinmenge lag. Der in den Vorversuchen abgedeckte pH-Bereich von 3 - 10 hatte gezeigt, dass sich der Hauptanteil der Proteine im pH-Bereich von pH 4 - 7,5 befand. Für die Proteomanalyse wurde der pH-Bereich von pH 4 - 7 gewählt, damit der Hauptanteil des Proteoms analysiert werden konnte und gleichzeitig der schmale pH-Gradient eine gute Auflösung ermöglichte. Dieser Gradient hatte zudem den Vorteil, dass die stark sauren und basischen Bereiche vermieden wurden. In diesen Bereichen ist die Auflösung der Proteine durch die üblichen Methoden der 2D-Gelanalyse problematisch. Die Darstellung saurer oder basischer Proteine ist durch Optimierung der isoelektrischen Fokussierung jedoch möglich geworden (Görg et al., 1997b; Westbrook et al., 2001; Bae et al., 2003).

Proteine, die nur in geringer Zahl in einem Proteom vorkommen, werden oft durch andere Proteine überdeckt und daher häufig bei 2D-Gelanalysen nicht berücksichtigt. Um diese Proteine ebenfalls in die Analyse mit einzubeziehen und auch um den hohen Probenverlust durch enge pH-Gradienten zu minimieren, wurden neue Methoden zur Vorfraktionierung der Proben entwickelt. Somit wird die klassische 2D-Gelanalyse um eine Dimension erweitert. Auch die Vorfraktionierung beruht meist auf dem Prinzip der isoelektrischen Fokussierung, sei es mittels Sephadex Gelen, *microscale solution isoelectric focusing* oder Gradiflow™ (Görg et al., 2002; Zuo und Speicher, 2002; Locke et al., 2002). Der Unterschied besteht darin, dass die Proteine der kompletten Probe vollständig nach ihren isoelektrischen Punkten getrennt werden und dann nur ein bestimmter pH-Bereich entnommen wird. Dieser wird anschließend in der ersten Dimension eingesetzt. Da die anderen pH-Bereiche aber für weitere Analysen zur Verfügung stehen, wird der Materialverlust minimiert. Neben der Vermeidung von Probenverlusten dient die Vorfraktionierung auch dazu, die für die Analyse

interessanten Proteine bereits vorab anzureichern. Dadurch können Proteine mit niedriger Kopienzahl oder mit biochemischen Eigenschaften, welche die Trennung oder das Einwandern in das Gel verschlechtern (z. B. Hydrophobizität), trotzdem analysiert werden. Ohne die Vorfraktionierung würden solche Proteine durch andere, zahlreichere oder hydrophilere Proteine überlagert und folglich in der Analyse unberücksichtigt bleiben. Hierzu muss die Trennung in der Vorfraktionierung nicht zwangsläufig nach dem isoelektrischen Punkt stattfinden. Sie kann auch durch gezielte Anreicherung einer Proteinfraction, wie hier durch die DDF geschehen, erfolgen.

Mit dem hier eingesetzten pH-Gradienten von pH 4 - 7 wurden durch die Proteomanalyse der Proben aus den mit und ohne Glucuronolacton behandelten Hepatozyten insgesamt 113 unterschiedliche Spots gefunden. Die Anzahl der differentiellen Spots variiert in Abhängigkeit von den verwendeten Auswahlkriterien. Durch Software gestützte Analyse war es möglich, nicht nur die Spots als differentiell zu erkennen, die nur in einer Gruppe vorhanden waren, sondern auch solche die in beiden Gruppen vor kamen, sich aber in ihrer Intensität unterschieden. Voraussetzung für die Färbung der Proteingele ist die Wahl einer Methode, in der die Proteine proportional zu ihrer Menge gefärbt werden. Ferner muss die Färbung einen Endpunkt erreichen. Beides wurde durch das hier verwendete Sypro Ruby™ gewährleistet, während eine Silberfärbung beispielsweise keinen Endpunkt erreicht und deshalb nur für Übersichtsgele eingesetzt wurde. Mit Hilfe der Software Z3 und PDQuest™ wurden die Intensitätsunterschiede der Spots durch einen Faktor darstellbar und konnten zudem in einem Statistiktest (Student's T-Test) auf ihre Signifikanz geprüft werden. So wurde jedem Spot in der Hepatozytenanalyse ein Qualitätsmerkmal zugeordnet, abhängig davon, ob er sich in der Intensität zwischen den Gelen nur geringfügig (Faktor < 3) oder sehr deutlich unterschied (Faktor ≥ 3). Die Genauigkeit der Analyse der differentieller Spots ist abhängig von der Menge der zur Verfügung stehenden Gele. Im Falle der Hepatozytenstudie wurden jeweils 6 Gele miteinander verglichen, während in der Studie der Endothelzellen je 4 Gele pro Gruppe untersucht wurden. Für statistische Zwecke sind 6 Gele ausreichend, um auch geringfügige, signifikante (Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$) Unterschiede feststellen zu können. Mit maximal vier Gelen verschlechterte sich die statistische Auswertung der Gele. Aus diesem Grund wurde in der Endothelzellstudie die geringere Gelanzahl durch stringenter Kriterien für die Ermittlung von Unterschieden ausgeglichen. Spots wurden erst dann als differentiell eingestuft, wenn sie sich mindestens um den Faktor 3 und statistisch signifikant im Student's T-Test, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,01$, in ihrer Intensität unterschieden. Diese Bedingungen erfüllten in den 2D-Gelanalysen mit Taurin, Koffein und Glucuronolacton durchschnittlich je 35 Spots.

Von den 113 differentiellen Spots aus dem Vergleich zwischen Glucuronolacton-behandelten Hepatozyten und der Kontrolle, konnten 79 % aus den 2D-Gelen isoliert werden. Identifiziert

wurden 26 % der isolierten Spots bzw. 20 % aller differentiellen Spots mit Hilfe von MALDI-TOF-Analysen und anschließender Datenbankrecherche (Abb. 36). Von 34 % der differentiellen Spots wurden pro Spot fünf oder mehr Peptidmassen ermittelt, die in der Datenbankrecherche jedoch keinem Protein eindeutig zugeordnet werden konnten.

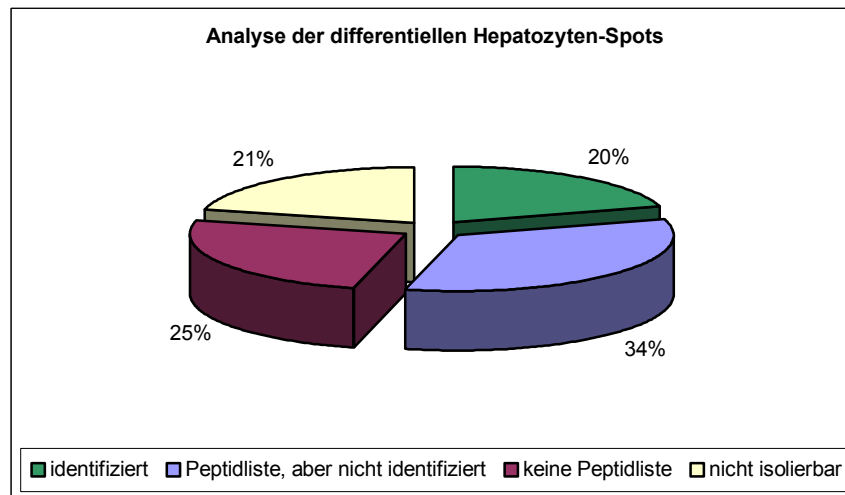


Abb. 36. Einteilung der differentiellen Spots aus dem Hepatozytenexperiment in unterschiedliche Kategorien entsprechend ihres Analysestandes. Die Kategorie „keine Peptidliste“ enthält auch sehr kurze Peptidlisten mit 4 oder weniger Peptidmassen.

Für 25 % der Spots wurden aus den MALDI-Spektren keine oder nur kurze (mit weniger als fünf Peptidmassen) Peptidlisten erstellt. Die Tatsache, dass nicht alle differentiellen Spots auch aus den Gelen isoliert werden konnten, hing mit der hohen Sensitivität des verwendeten Farbstoff Sypro Ruby™ zusammen. Damit war es möglich auch Spots mit sehr schwacher Intensität auf den Gelbildern, die mittels Laserscanner aufgenommen wurden, zu analysieren. Einige dieser schwachen Spots konnten aber nicht mit dem Auge wahrgenommen und somit auch nicht isoliert bzw. aus den Gelen ausgestochen werden. Allerdings wären durch Verwendung eines minder sensitiven Farbstoffes, wie Coomassie Brilliant Blau insgesamt weniger Spots analysiert und damit wahrscheinlich auch weniger isoliert worden. Eine Verbesserung der Spotausbeute bei der Isolierung wäre durch die Verwendung eines speziellen Roboters („Spotpicker“) möglich gewesen. Ein solches Gerät stand aber im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung.

Ein Viertel der isolierten Spots konnte anschließend durch die MALDI-TOF-Analyse und Datenbankrecherche identifiziert werden. Die Ausbeute in diesem Versuchsteil ist abhängig von einer Reihe von Faktoren. Zu den wichtigsten gehören dabei die Probenvorbereitungen für die MALDI-Analyse, also die Spothydrolyse und die Auftragsmethode der Peptide auf den Probesteller. Hier wurden durch die Modifikation beschriebener Protokolle einige Verbesserungen erzielt (s. 4.5.3). So wurde die Peptidausbeute erhöht durch Verwendung von Dimethylformamid in der Hydrolyse, dem Trocknen mit anschließendem Resuspendieren in

geringerem Volumen der hydrolysierten Peptide und durch direktes Auftragen der Probe auf den Probenhalter. Durch vorherige Behandlung des Probenhalters mit einem Teflonband oder durch Auftragen der Proben auf ein fixiertes Teflonband nach Yuan und Desiderio (2002) wurde keine Verbesserung der MALDI-Analyse erreicht (Daten nicht gezeigt). Teilweise wurden bis zu vier identische Spots aus unterschiedlichen Gelen einer Gruppe zusammen hydrolysiert. Der Effekt auf die MALDI-Analyse war aber vernachlässigbar. Der Grund hierfür könnte sein, dass durch mehrere Spots auch das Hydrolysevolumen zunimmt und damit die Proteinkonzentration, wenn überhaupt, nur wenig steigt. Es ist auch möglich, dass deutlich mehr als vier Spots in der Hydrolyse eingesetzt werden müssen, um eine in der MALDI-Analyse messbare Peptidanreicherung zu erhalten. Hohe Spotzahlen bedeuten aber gleichzeitig auch viele Gele und damit einen hohen experimentellen Aufwand. Um die Peptidmenge für die MALDI-Analyse zu steigern, wurde im Vorfeld der Probenvorbereitung auch versucht, die Proteinkonzentration der Proben durch sogenannte Trichtergele zu erhöhen. Diese Versuche hatten allerdings keinen Erfolg (Daten nicht gezeigt). In der Datenbankrecherche konnte nicht jeder Peptidmassenliste ein Protein zugeordnet werden. Hierfür gibt es zahlreiche Gründe:

- unvollständige Peptidmassenlisten
- Kontaminationen, vor allem durch Keratin
- spezifische Modifikation der Peptide
- durch unspezifische Hydrolyse entstandene Peptidfragmente
- Peptidmassenliste resultierte aus Proteingemisch

Von den differentiellen Proteinen wurden sechs dem Entgiftungsstoffwechsel zugeordnet. Die Spotintensitäten der Catechol-O-Methyltransferase, der Ornithin-Transcarbamoyltransferase, der Glutathion S-Transferase und der Katalase waren nach Behandlung der Hepatozyten mit Glucuronolacton in den Gelen erhöht, während die der Dismutase und der Aldehyd-Dehydrogenase schwächer waren.

Die Catechol-O-Methyltransferase katalysiert die o-Methylierung und damit die Inaktivierung des Neurotransmitters Catecholamin und der Hormone, die auf Catechol basieren. Außerdem verkürzt es die Halbwertszeit einiger neuroaktiver Arzneimittel, wie L-Dopa. Die cytoplasmatische Glutathion S-Transferase fungiert als Oxidationsschutz und konjugiert reduziertes Glutathion zu einer Reihe endo- und exogener hydrophober Substrate. Sowohl die Catechol-O-Methyltransferase als auch die Glutathion S-Transferase sind an der Phase II der Biotransformation beteiligt. Allerdings dient im Gegensatz zur UDP-Glucuronosyltransferase keinem der beiden Enzyme die Glucuronsäure als Substrat. Die Aufgabe der Katalase ist der Schutz vor radikalischer Oxidation durch die Inaktivierung von Wasserstoffperoxid. Die Glucuronsäure könnte durch den von Marsh (1986) vorgeschlagenen

Mechanismus über die Fenton-Reaktion auch an dem Abbau von Wasserstoffperoxid beteiligt sein. Die Ornithin-Transcarbamoyltransferase katalysiert den zweiten Schritt im Harnstoffzyklus und spielt so bei der Arginin Biosynthese und der Entsorgung von Ammoniak eine Rolle. Einerseits wäre es denkbar, dass Glucuronolacton eventuell über die Glucuronsäure, Entgiftungsenzyme induziert, die vergleichbare Stoffwechselfunktionen erfüllen, wie die an denen die Glucuronsäure beteiligt ist. Andererseits passt die Ornithin-Transcarbamoyltransferase nicht in dieses Bild. Sie ist zwar an Entgiftungsprozessen beteiligt, diese unterscheiden sich jedoch von denen die bisher für Glucuronolacton oder Glucuronsäure beschrieben wurden. Glucuronolacton könnte auch allgemeine Entgiftungsreaktionen induzieren. Dagegen spricht allerdings die Tatsache, dass der Spot des Enzyms Dismutase, das die Inaktivierung des reaktiven Superoxidanions zu Wasserstoffperoxid katalysiert, nach Behandlung mit Glucuronolacton weniger intensiv war. Der Spot der Aldehyd-Dehydrogenase wurde nur in Gelen der Gruppe ohne Glucuronolacton beobachtet. Dieses Enzym katalysiert unter anderem die reversible Oxidation von Glucuronolacton zu Glucarat. Durch die Aldehyd-Dehydrogenase könnte auch eine Versorgung des Organismus mit einer ausreichenden Menge an Glucuronolacton oder seiner Metabolite, von Glucarat ausgehend, reguliert sein. Die Unterschiede in der Spotintensität geben jedoch nur Hinweise auf die verschiedenen Zustände eines Proteins, sei es durch unterschiedliche Expression oder durch posttranslationale Modifikationen. Sie sagen dagegen nichts über die Aktivität oder Funktionalität des Proteins aus. Zur Klärung der Zusammenhänge ist deshalb die Durchführung weiterführender Studien erforderlich. Hinzu kommt, dass nicht alle Spots identifiziert wurden und deshalb erst ein Teil der Veränderungen analysiert wurde. Fünf der identifizierten Proteine, Gelsolin, Cytokeratin-8-Polypeptid, Cytokeratin-EndoB, gamma-Aktin und Septin-6 erfüllen Funktionen im Cytoskelett. Kontaminationen der Proben mit Haut- oder Haarfragmenten zwischen der Spotisolierung und der Hydrolyse können zu „falsch positiv“ identifizierten Proteinen führen, da diese Fragmente sehr keratinreich sind und so den Proteinanteil der Probe überlagern könnten. Die beiden hier aufgeführten Keratine wurden jedoch in Ratte bzw. Maus beschrieben und darüber hinaus ist zumindest das Cytokeratin-8-Polypeptid als Bestandteil von Leberzellen bekannt. Folglich wurden diese Keratine als Probenproteine und nicht als Kontaminationen eingestuft. Das Cytoskelett verleiht den Zellen als Gerüst ihre Form und verbindet die Zellorganellen miteinander. Durch seine dynamischen Eigenschaften ist es im ständigen Wandel, um die Zellen an die gegebenen Bedingungen anzupassen. Eine Funktion von Cytokeratinen und dem Cytoskelett im Phänotyp der *multi-drug-resistance* wird diskutiert (Cress und Dalton, 1996). Jedoch ist es wahrscheinlicher, dass die hier beobachteten Veränderungen im Cytoskelett auf die modifizierte Proteinexpression in der Zelle zurückzuführen waren. Der Funktion der Proteinfaltung wurden vier der differentiellen

Proteine zugeordnet, nämlich das Hitze-Schock-Protein 90 (HSP 90) sowie ein HSP 90 homologes Protein, die endoplasmatische Oxidoreduktase 1 und die Protein Disulfid-Isomerase. Ferner wurde eine NADH-Dehydrogenase, ein als Motor Protein (D21092) charakterisiertes Protein, das Apolipoprotein E und ein hypothetisches Protein identifiziert. Zwei der differentiell exprimierten Proteine, Apolipoprotein A-1 und das *Translationally Controlled Tumor Protein* (TCTP) unterschieden sich in ihrer Position im 2D-Gel. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass die Behandlung mit Glucuronolacton zu unterschiedlichen Modifikationen der beiden letzten Proteine führte. Der Zusammenhang zwischen der differentiellen Expression dieser Proteine und der Inkubation mit Glucuronolacton kann nur durch zusätzliche Experimente geklärt werden. Hierzu wäre es z. B. sinnvoll die Ergebnisse durch Western-Blot oder Real-Time-PCR zu bestätigen. Anschließend könnten posttranslationale Modifikationen eingehender untersucht werden. Dies wäre ebenfalls durch 2D-Gelanalysen mit vorheriger Deglykosylierung der Proben oder durch gezielte Markierung solcher Modifikationen z. B. mit dem Farbstoff Pro-Q Emerald 300 für Glykosylierungen oder Pro-Q Diamond für Phosphorylierungen möglich (Schulenberg et al., 2003; Martin et al., 2003). Die Enzyme aus dem Entgiftungsstoffwechsel könnten durch Aktivitätstests intensiver analysiert werden. Es wurde in diesen 2D-Gelanalysen gezeigt, dass Glucuronolacton in der Lage ist, die Proteinexpression von Ratten-Hepatozyten zu verändern. Einem Teil der identifizierten Proteine wurden Funktionen im Entgiftungsstoffwechsel zugeordnet. Die Frage, wie sich Glucuronolacton auf diese Funktionen auswirkt und welche Rolle es bei der Expression der anderen identifizierten Proteine spielt, könnte als Grundlage für weitere Arbeiten dienen.

Entgiftungswege im Endothel der Hirnkapillaren, wie auch andere Barriereigenschaften der Blut-Hirn-Schranke sind entscheidende Faktoren für die Funktionalität des Gehirns. Alle Substanzen, die nicht im Gehirn selbst synthetisiert werden, müssen erst mit der BHS interagieren, bevor sie im Gehirn wirken können. Substanzbedingte Veränderungen in der Schrankenfunktion können auch direkt oder indirekt Auswirkungen auf das Gehirn haben, ohne dass die Stoffe mit diesem in Kontakt gekommen sind. Deshalb wurde in weiteren Proteomanalysen untersucht, ob die Inhaltsstoffe Taurin, Glucuronolacton und Koffein aus den *Energy Drinks* zu einer Veränderung im Proteinmuster des Hirnkapillarendothels führten. In den 2D-Gelanalysen der cerebralen Endothelzellen wurden für Glucuronolacton 33, für Taurin 32 und für Koffein 42 Spots als differentiell identifiziert. Alle drei Substanzen waren also in der Lage, das Proteinmuster der Endothelzellen zu verändern. Für Koffein und Taurin wurde eine Veränderung in der Proteinexpression erwartet. Für beide Substanzen wurde eine Wirkung auf bestimmte Proteine der Zelle bereits beschrieben, für Koffein über den Adenosinrezeptor-Antagonismus und für Taurin durch die Regulation des TAUT-Transporters. Die Adenosinrezeptoren A_{2A} und A₃ konnten im Hirnkapillarendothel aus Rind

nachgewiesen werden (Schaddelee et al., 2003). Zumindest über den A₂-Rezeptor ist Adenosin an der Regulation des Aspartat- und Glutamat-Transportes über die BHS beteiligt (Grant et al., 2003). Ob die hier beobachteten Veränderungen tatsächlich aus diesen Wirkungen resultieren oder ob sie durch andere Effekte hervorgerufen wurden, konnte zu diesem Zeitpunkt nicht festgestellt werden. Auch für Glucuronolacton konnte eine Veränderung auf Proteinebene im Endothel nachgewiesen werden. Worin die Änderungen im einzelnen bestehen, die durch diese drei Substanzen ausgelöst wurden, kann nur durch weiterführende Experimente geklärt werden. Hierzu bieten sich, wie schon bei den Hepatozyten, MALDI-TOF-Analysen an. ESI-Analysen würden zwar eine einfachere Probencharakterisierung als MALDI-TOF-MS erlauben, aber hierfür wäre wegen der niedrigeren Sensitivität eine höhere Proteinkonzentration nötig. Die Proteinkonzentration erwies sich jedoch bereits für die MALDI-Analyse als kritischer Faktor, so dass ESI-Analysen ohne eine geeignete Möglichkeit zur Peptidanreicherung keine brauchbare Alternative wären.

Zur Klärung, ob diese Substanzen, vor allem Glucuronolacton, in der Lage sind die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren, wurden neben den Proteomanalysen auch Transportstudien durchgeführt. Die Fähigkeit des Koffeins, die Blut-Hirn-Schranke nahezu ungehindert zu passieren, war bereits mehrfach beschrieben und wurde in der Arbeitsgruppe auch für das in dieser Arbeit verwendete BHS-Modell bestätigt (Pelzer, persönliche Mitteilung). Der von Kang et al. (2002) in immortalisierten Ratten-Hirnkapillarendothel beschriebene Taurintransporter TAUT, konnte auf mRNA-Ebene in den Endothelzellen aus frisch isolierten Schweinehirnkapillaren nachgewiesen werden. Die Expression des Transporters in dem hier verwendeten BHS-Modell galt somit als sehr wahrscheinlich. Aus diesem Grunde wurde ferner angenommen, dass der Transport des Taurins in diesem Modell analog zu dem von Kang et al. (2002) beschriebenen abläuft. Auf Transportstudien mit Taurin wurde deshalb verzichtet. Der letztendliche Beweis für die Funktionalität von TAUT müsste z. B. über Transportanalysen mit einem spezifischen Inhibitor geführt werden. Calmidazolium konnte in Makrophagen aus Mäusen die Transportaktivität von TAUT vollständig blockieren (Kim et al., 2000). In Vorversuchen der Transportstudien wurde der Einfluss von Glucuronolacton auf die charakteristischen Blut-Hirn-Schranke Marker Permeabilität und elektrischer Widerstand (TEER) bestimmt. Glucuronolacton hatte keinen Einfluss auf die Permeabilität des BHS undurchlässigen Na-Fluoresceins. Der transendotheliale elektrische Widerstand erwies sich ebenfalls als Glucuronolacton unabhängig. Die Schrankeneigenschaften im *in vitro* BHS-Modell blieben also erhalten. Daraus folgte, dass die beobachtete Permeabilität des Glucuronolactons als hydrophiles Molekül auf Transportprozesse zurückzuführen war und nicht auf eine verminderte Schrankenfunktion. Für die folgenden Transportstudien wurden zum Nachweis des Glucuronolactons, die Proben aus dem Transwellssystem mit 1-Phenyl-3-

methyl-5-pyrazolon (PMP) derivatisiert, nachdem zuvor das Glucuronolacton basen-katalysiert zur Glucuronsäure hydrolysiert wurde. Obwohl PMP allgemein mit reduzierenden Zuckern reagiert, konnten die Signale der PMP-Glucuronsäure, der PMP-Glucose und von ungebundenem PMP in der HPLC-Analyse eindeutig unterschieden werden. Zudem war die Signalfäche proportional zur Konzentration, wodurch eine gleichzeitige, quantitative Analyse beider Zucker ermöglicht wurde. Allerdings war eine Probenlagerung bei +4 °C für ein bis zwei Tage nicht ausreichend, um die Reproduzierbarkeit der Analyse zu gewährleisten. Vor allem, wenn die Proben noch nicht mit PMP behandelt wurden, was abhängig von der Probenanzahl nicht immer möglich war. Die Lagerung bei -20 °C führte generell zu einer deutlichen Verbesserung der Reproduzierbarkeit. Die Trennschärfe der HPLC-Analyse nahm im Laufe der Versuchsreihe deutlich ab und konnte durch Reinigen der C₁₈-Säule mit Methanol, Isopropanol oder 90 %iger (v/v) Essigsäure nicht wieder hundertprozentig hergestellt werden. Möglicherweise führten lösliche Proteine in der Probe zu einer Verstopfung der Säule. Für weitere Versuche könnte es sich deshalb als sinnvoll erweisen, die Proben vor der HPLC-Analyse einer Proteinfällung zu unterziehen. Wie sich dies allerdings auf die Reproduzierbarkeit auswirken würde, müsste in diesem Zusammenhang untersucht werden.

In den Transportstudien konnte erstmals gezeigt werden, dass Glucuronolacton *in vitro* über die BHS transportiert wird. Die in der analysierten Zeitspanne von 120 min basolateral gemessene Glucuronolactonkonzentration war vergleichbar mit der in derselben Zeit erreichten basolateralen Glucosekonzentration. Der Konzentrationsanstieg beider Zucker war innerhalb der 120 min linear, so dass sich noch kein Gleichgewicht zwischen apikaler und basolateraler Stoffmenge eingestellt hatte. McAllister et al. (2001) hat in dem von ihm verwendeten BHS-Modell, mit Rinder-Aortenendothel und Rattenastrocyten jeweils auf einer Seite eines Filters, ein Glucoseverhältnis zwischen abluminal und luminal von 0,85 beobachtet. In dem hier verwendeten Modell lag dieses Verhältnis nach 120 min zwischen 0,12 und 0,19 was ebenfalls dafür spricht, dass noch kein Gleichgewicht erreicht wurde.

Die Transportrate von Glucuronolacton zeigte in An- oder Abwesenheit von Glucose im basolateralen Kompartiment Unterschiede. In Gegenwart von Glucose auf der basolateralen Seite war ein erhöhter Transport von Glucuronolacton nachweisbar. Dies legt die Vermutung nahe, dass beide Substanzen Substrate desselben Transportsystems sind. Diese These wird durch die Beobachtung unterstützt, dass der Transport von Glucose durch die Anwesenheit von Glucuronolacton vermindert wird. Dies könnte durch eine kompetitive Hemmung erklärt werden. Die Abnahme der Transportrate von Glucose war jedoch nicht signifikant, weshalb es sinnvoll wäre dies durch weiterführende Experimente zu bestätigen. Des Weiteren widersprechen die Ergebnise der Zeitreihenexperimente dieser These, da hier entgegengesetzte Beobachtungen gemacht wurden. Allerdings waren die Test-

bedingungen bei den Zeitreihenexperimenten nicht identisch mit denen der anderen Transportstudien. Der Unterschied beruhte darauf, dass für die Zeitreihen die Zellen zur Probenentnahme oft für kurze Zeit aus dem Brutschrank genommen wurden und deshalb während des gesamten Versuchs anderen Inkubationsbedingungen ausgesetzt waren. Außerdem wurden in den Zeitreihen nicht nur hohe Messschwankungen beobachtet, sondern auch keine apikalen Konzentrationen gemessen. Eine Möglichkeit die Unterschiede in der Transportrate durch weitere Versuche eindeutig zu klären, wäre die mehrfache Wiederholung der Transportstudien nach 120 min, um die Statistik und damit die Standardabweichung zu verbessern. Gerade bei geringfügigen Unterschieden ist es zweckmäßig, die Messschwankungen zu minimieren. Die Effekte auf die Transportrate könnten auch durch erhöhte Substanzkonzentrationen, unter der Annahme damit in den Bereich der Kapazitätsgrenze der Transporter zu kommen, verstärkt werden. Für das hier verwendete Modell ist dies hingegen nicht praktikabel, weil die Glucuronolactonkonzentration mit 1 mg/ml schon nahe an der Grenze zur Cytotoxizität liegt und eine Konzentrationserhöhung somit zellschädigende Folgen hätte. Hingegen wäre es hilfreich die Transportexperimente mit einem Glut-1-Inhibitor wie z. B. Phloretin zu wiederholen. Dadurch könnte geklärt werden, ob der Transport von Glucuronolacton ebenso wie der von Glucose hauptsächlich über den Glut-1-Transporter vermittelt wird.

Ein mögliche kompetitive Hemmung des Glucosetransports durch Glucuronolacton sollte *in vivo* dagegen keine Rolle spielen, weil hier die Glucuronolactonkonzentration, wahrscheinlich selbst nach dem Konsum von *Energy Drinks*, deutlich niedriger ist als die experimentell verwendete. Zudem ist das Glucosegleichgewicht *in vivo* bereits eingestellt, so dass bestenfalls durch einen plötzlich stark ansteigenden Glucosebedarf des Gehirns, eine potentielle kompetitive Hemmung durch das Glucuronolacton möglich wäre. Dies setzt natürlich voraus, dass die Affinität beider Substrate auch vergleichbar ist, worüber bisher jedoch noch nichts bekannt ist.

In Ratten wurde mit MCT-1 ein Monocarbonsäure-Transporter an der BHS beschrieben, der alternativ zum Glut-1-Transporter in weiterführenden Studien ebenfalls als potentieller Transporter für Glucuronolacton untersucht werden könnte (Tamai und Tsuji, 2000).

Die Darstellung der Messwerte aus der Transportstudie durch ihren Permeabilitätskoeffizienten (P_e) ermöglicht es, die Transportrate des Glucuronolactons und der Glucose im Verhältnis zu anderen Substraten, die im verwendeten BHS-Modell untersucht wurden, zu betrachten. Darüber hinaus kann das verwendete System mit Literaturwerten aus anderen Permeabilitätsstudien verglichen werden. Für das als BHS durchlässig geltende Koffein wurde in dem hier eingesetzten BHS-Modell ein $P_e \times 10^{-6}$ - Wert von 50,5 cm/s ermittelt, während für die nicht permeable Sucrose 1,05 cm/s und für die Aminosäure Leucin 16,8 cm/s gemessen wurden (persönliche Mitteilung, Pelzer). Der $P_e \times 10^{-6}$ - Wert für

Glucuronolacton liegt mit 19,3 cm/s in derselben Größenordnung wie das Leucin. Dies gilt auch für die Glucose in Abwesenheit von Glucuronolacton (13,06 cm/s). In Anwesenheit sinkt die Permeabilität der Glucose jedoch um knapp ein Drittel auf 9,06 cm/s. Die Permeabilität von Glucuronolacton *in vitro* liegt also im selben Bereich, wie die von anderen Substanzen, welche die BHS durch Transportsysteme überqueren. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass Glucuronolacton die BHS transportervermittelt passiert. Da die Glucosewerte eine hohe Standardabweichung aufweisen, sind wie oben schon erwähnt, weitere Messungen nötig, um den genauen Einfluss von Glucuronolacton auf den Glucosetransport zu bestimmen. Die Permeabilitätswerte dieses *in vitro* Modells stehen in guter Korrelation zu den *in vivo* beobachteten Permeabilitäten (Franke et al., 1999).

7 Literaturverzeichnis

Aigner A, Wolf S, Gassen HG (1997).

Transport und Entgiftung: Grundlagen, Ansätze und Perspektiven für die Erforschung der Blut-Hirn-Schranke.

Angewandte Chemie 109 25 - 42.

Armstrong LE (2002).

Caffeine, body fluid-electrolyte balance, and exercise performance.

Int J Sport Nutr Exerc Metab. Jun;12(2):189-206. Review.

Arthur FE, Shivers RR, Bowman PD (1987).

Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium: an efficient in vitro model.

Brain Res. Nov;433(1):155-9.

Bae SH, Harris AG, Hains PG, Chen H, Garfin DE, Hazell SL, Paik YK, Walsh BJ, Cordwell SJ (2003).

Strategies for the enrichment and identification of basic proteins in proteome projects.

Proteomics. May;3(5):569-79.

Betz AL, Firth JA, Goldstein GW (1980).

Polarity of the blood-brain barrier: distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells.

Brain Res. Jun 16;192(1):17-28.

bgvv (2002).

Gesundheitliche Bewertung von Energydrinks.

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin. Stellungnahme vom 18. März 2002.

Birdsall TC (1998).

Therapeutic applications of taurine.

Altern Med Rev. Apr;3(2):128-36. Review.

Blum M, Beier, H, Gross, HJ (1987).

Improved silverstaining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels.

Electrophoresis 8, 93-99

Bonati M, Latini R, Galletti F, Young JF, Tognoni G, Garattini S (1982).

Caffeine disposition after oral doses.

Clin Pharmacol Ther. Jul;32(1):98-106.

Bradford, MM (1976).

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal. Biochem. 72: 248-254

Brightman MW und Tao-Cheng JH, (1993).

Tight junctions of Brain Endothelium and Epithelium.

in: *The Blood-Brain-Barrier* (Pardridge MW, Hrsg.) 107-125. raven Press, New York.

Burnette WN (1981).

Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein

A. Anal Biochem. Apr;112(2):195-203

Callen DF, Baker E, Simmers RN, Seshadri R, Roninson IB (1987).

Localization of the human multiple drug resistance gene, MDR1, to 7q21.1.

Hum Genet. Oct;77(2):142-4.

Chin JE, Soffir R, Noonan KE, Choi K, Roninson IB (1989).

Structure and expression of the human MDR (P-Glykoprotein) gene family.

Mol Cell Biol. Sep;9(9):3808-20.

Christensen HN (1990).

Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism.

Physiol Rev 70:43–77.

Cress AE, Dalton WS (1996).

Multiple drug resistance and intermediate filaments.

Cancer Metastasis Rev. Dec;15(4):499-506. Review.

Crone C, Olesen SP (1982).

Electrical resistance of brain microvascular endothelium.

Brain Res. Jun 3;241(1):49-55.

Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R (2001).

The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily.

Genome Res. Jul;11(7):1156-66. Review.

Dehouck MP, Méresse S, Delorme P, Fruchart JC, Cechelli R (1990).

An Easier, Reproducible, and Mass-Production Method to Study the Blood-Brain Barrier In Vitro"

J. Neurochem. 54: 1798-1801.

Della Corte L, Crichton RR, Duburs G, Nolan K, Tipton KF, Tirzitis G, Ward RJ (2002).

The use of taurine analogues to investigate taurine functions and their potential therapeutic applications.

Amino Acids. 23(4):367-79. Review.

Demeule M, Régina A, Jodoin J, Laplante A, Dagenais C, Berthelet F, Moghrabi A, Béliveau R (2002).

Drug transport to the brain: Key roles for the efflux pump P-Glykoprotein in the blood–brain barrier.

Vascular Pharmacology 38 339– 348.

Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. (2001).

Stellungnahme des DGE-Arbeitskreises „Sport und Ernährung“: Taurin in der Sporternährung.

http://www.dge.de/Pages/navigation/fach_infos/dge_info/2001/fkp0801.html

Dermietzel R, Krause-Finkeldey D, Faustmann P (2001).

Checkpoint im Gehirn: Jetzt in der Kulturschale.

Rubin 1/2001 (http://www.ruhr-uni-bochum.de/rubin/rbin1_01/medizin/Beitrag4/).

Di Filippo NM, Blumenthal HJ (1972).

Experimental cholelithiasis in the golden hamster: effect of glucuronolactone.
J Am Osteopath Assoc. Nov;72(3):288-93.

Eisenblätter T, Hüwel S, Galla HJ (2003).

Characterisation of the brain multidrug resistance protein (BMDP/ABCG2/BCRP) expressed at the blood–brain barrier.
Brain Research. 971 221–231.

Farrell CL, Pardridge WM (1991).

Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrically distributed on brain capillary endothelial luminal and abluminal membranes: an electron microscopic immunogold study.
Proc Natl Acad Sci U S A. Jul 1;88(13):5779-83.

Fernández MJ, López A, Santa-Maria A (2003).

Apoptosis induced by different doses of caffeine on Chinese hamster ovary cells.
J Appl Toxicol. Jul-Aug;23(4):221-4.

Fishman WH, Smith M, Thompson DB, Bonner CD, Kasdon SC, Homburger F (1951).

J. clin. Invest. 30, 685.

Franke H, Galla HJ, Beuckmann CT (1999).

An improved low-permeability in vitro-model of the blood-brain barrier: transport studies on retinoids, sucrose, haloperidol, caffeine and mannitol.
Brain Res. Feb 6;818(1):65-71.

Franke H, Galla H, Beuckmann CT (2000).

Primary cultures of brain microvessel endothelial cells: a valid and flexible model to study drug transport through the blood-brain barrier in vitro.
Brain Res Brain Res Protoc. Jul;5(3):248-56

Frey A, Meckelein B, Weiler-Guttler H, Mockel B, Flach R, Gassen HG (1991).

Pericytes of the brain microvasculature express gamma-glutamyl transpeptidase.
Eur J Biochem. Dec 5;202(2):421-9.

Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S (1993).

Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions.
J Cell Biol. Dec;123(6 Pt 2):1777-88.

Gaillard PJ, Voorwinden LH, Nielsen JL, Ivanov A, Atsumi R, Engman H, Ringbom C, de Boer AG, Breimer DD, (2001).

Establishment and functional characterization of an in vitro model of the blood-brain barrier, comprising a co-culture of brain capillary endothelial cells and astrocytes.
Eur J Pharm Sci. Jan;12(3):215-22.

Germershaus O und Imming P (2001).

Kaffee und Tee – Alltagsdrogen oder Allheilmittel.
Pharmazeutische Zeitung. 50 Titelbeitrag.

Görg A, Boguth G, Obermaier C, Scheibe B und Weiss W (1997a).

Hochauflösende zweidimensionale Gelelektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG-Dalt).

Kursmanual, H.Lassing Druck, München

Görg A, Obermaier C, Boguth G, Csordas A, Diaz JJ und Madjar JJ (1997b).

Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins.

Electrophoresis 18, 328-337.

Görg A, Boguth G, Kopf A, Reil G, Parlar H, Weiss W (2002).

Sample prefractionation with Sephadex isoelectric focusing prior to narrow pH range two-dimensional gels.

Proteomics. Dec;2(12):1652-7.

Grant GA, Meno JR, Nguyen TS, Stanness KA, Janigro D, Winn RH (2003).

Adenosine-induced modulation of excitatory amino acid transport across isolated brain arterioles.

J Neurosurg. Mar;98(3):554-60.

Greenwood J (1992).

Characterization of a rat retinal endothelial cell culture and the expression of P-Glykoprotein in brain and retinal endothelium in vitro.

J Neuroimmunol. Jul;39(1-2):123-32.

Guengerich FP (1995).

Influence of nutrients and other dietary materials on cytochrome P-450 enzymes.

Am J Clin Nutr. Mar;61(3 Suppl):651S-658S. Review.

Harigaya S (1964).

Studies of Glucosaccharolactone. 3. Inhibition of beta-Glucuronidase in vivo by Glucosaccharo-1:4, 3:6-cilactone and other lactones.

J Biochem (Tokyo). Nov;56:400-7.

Harlowe und Lane (1988).

Antibodies. A Laboratory manual.

Cold Spring Harbour, New York

Hunter J, Maxwell JD, Carrella M, Stewart DA, Williams R (1971).

Urinary D-glucaric-acid excretion as a test for hepatic enzyme induction in man.

Lancet Mar 20;1(7699):572-5.

Huxtable R (1992).

Physiological actions of taurine.

Phys. Rev. 72.

Huxtable R (1996).

Taurine 2: basic and clinical aspects.

Advances in Experimental Medicine and Biology 403; Plenum Press; New York.

Huxtable RJ, (2000).

Expanding the circle 1975-1999: sulfur biochemistry and insights on the biological functions of taurine.

Adv Exp Med Biol. 483:1-25. Review.

Iwata H und Lombardini J (1989).

Taurine and the Heart.

Kluwer Academic Publishers, London.

Jafari M und Rabbani A (2000).

Dose and time dependent effects of caffeine on superoxide release, cell survival and DNA fragmentation of alveolar macrophages from rat lung.
Toxicology. Aug 21;149(2-3):101-8.

Kang YS, Ohtsuki S, Takanaga H, Tomi M, Hosoya K, Terasaki T (2002).

Regulation of taurine transport at the blood-brain barrier by tumor necrosis factor- α , taurine and hypertonicity.
J Neurochem. Dec;83(5):1188-95.

Khyse-Anderson J (1984).

Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.
J. Biochem. Biophys. Methods 10:203-209

Kim HW, Lee EJ, Kim WB, Kim BK (2000).

Ionomycin restores taurine transporter activity in cyclosporin-A treated macrophages.
Adv Exp Med Biol. 483:127-35.

Krause D, Kunz J, Dermietzel R (1993).

Cerebral pericytes--a second line of defense in controlling blood-brain barrier peptide metabolism.
Adv Exp Med Biol. 331:149-52.

Kunz J, Krause D, Kremer M, Dermietzel R (1994).

The 140-kDa protein of blood-brain barrier-associated pericytes is identical to aminopeptidase N.
J Neurochem. Jun;62(6):2375-86.

Lake BG, Longland RC, Harris RA, Gangolli SD, Rundle A (1982).

The excretion of metabolites of the D-glucuronic acid pathway in human urine. Effect of phenobarbitone administration.
Xenobiotica. Apr;12(4):241-7.

Locke VL, Gibson TS, Thomas TM, Corthals GL, Rylatt DB (2002).

Gradiflow as a prefractionation tool for two-dimensional electrophoresis.
Proteomics. Sep;2(9):1254-60.

Loeffler BMN (2000).

Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Coffein, Theophyllin und Theobromin beim Hund nach Aufnahme von Kaffee, Tee und Schokolade.
Inaugural-Dissertation in der Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig.

Lombardini J und Schaffer S (1992).

Taurine – Nutritional value and mechanisms of action.
Advances in Experimental Medicine and Biology 315; Plenum Press; New York.

Marsh CA (1963).

Metabolism of D-Glucuronolactone in mammalian systems.
Biochem J. ;86:77-.

Marsh CA (1986).

Biosynthesis of D-glucaric acid in mammals: a free-radical mechanism?
Carbohydr Res. Sep 15;153(1):119-31.

Märten S (2004).

Proteomanalyse an der Blut-Hirn-Schranke
Dissertation, TU-Darmstadt.

Martin K, Steinberg TH, Cooley LA, Gee KR, Beechem JM, Patton WF (2003).

Quantitative analysis of protein phosphorylation status and protein kinase activity on microarrays using a novel fluorescent phosphorylation sensor dye.
Proteomics. Jul;3(7):1244-55.

Matsui M, Kaizu T, Okada M, Ishidate M (1969).

Studies on the glucuronic acid pathway in the metabolism of D-glucuronic acid in mammals. 3. Determination of D-glucuronic acid in serum, with special reference to its level after administration of D-glucuronolactone and D-Glucarolactones to man.
Chem Pharm Bull (Tokyo). Sep;17(9):1871-7.

McAllister MS, Krizanac-Bengez L, Macchia F, Naftalin RJ, Pedley KC, Mayberg MR, Marroni M, Leaman S, Stanness KA, Janigro D (2001).

Mechanisms of glucose transport at the blood-brain barrier: an in vitro study.
Brain Res. Jun 15;904(1):20-30.

Merimee TJ, Kennedy AL, Mehl TD and Rosenbloom A (1981).

Serum glycosidase activity in diabetes mellitus.
Diabetes, Vol 30, Issue 2 115-118

Militante JD, Lombardini JB (2002).

Treatment of hypertension with oral taurine: experimental and clinical studies.
Amino Acids. 23(4):381-93. Review

Miller DW, Keller BT, Borchardt RT (1994).

Identification and distribution of insulin receptors on cultured bovine brain microvessel endothelial cells: possible function in insulin processing in the blood-brain barrier.
J Cell Physiol. Nov;161(2):333-41.

Mischek U, Meyer J, and Galla HJ, (1989).

Characterization of γ -glutamyl transpeptidase activity of cultured endothelial cells from porcine brain capillaries.
Cell Tissue Res. 256: 221 –226

Mitic LL, Anderson JM (1998).

Molecular architecture of tight junctions.
Annu Rev Physiol. 60:121-42. Review

Nabeshima S, Reese TS, Landis DM, Brightman MW (1975).

Junctions in the meninges and marginal glia.
J Comp Neurol. Nov 15;164(2):127-69.

Nehls V, Drenckhahn D (1993).

The versatility of microvascular pericytes: from mesenchyme to smooth muscle?
Histochemistry. Jan;99(1):1-12. Review.

Nohl T (1996).

Energy Drinks - Ein Thema für fächerverbindendes Unterrichten im Bereich Mensch und Umwelt ?
Examensarbeit, Pädagogische Hochschule Heidelberg.

Oberdisse E (2002).

Pharmakologie und Toxikologie, 3. Aufl. Berlin: Springer

Oka H, Suzuki S, Suzuki H, Oda T (1976).

Increased urinary excretion of L-xylulose in patients with liver cirrhosis.
Clin Chim Acta. Mar 1;67(2):131-6.

Oppolzer T (2004).

Analyse des Oberflächenproteoms von Hirnkapillarendothelzellen.
Dissertation, TU-Darmstadt.

Oredipe OA, Barth RF, Hanausek-Walaszek M, Sautins I, Walaszek Z and Webb TE (1987).

Effects of an inhibitor of β -glucuronidase on hepatocarcinogenesis.
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 28: 156.

Pardridge WM (1983).

Brain metabolism: a perspective from the blood-brain barrier.
Physiol Rev. Oct;63(4):1481-535.

Park BK, Kitteringham NR, Pirmohamed M, Tucker GT (1996).

Relevance of induction of human drug-metabolizing enzymes: pharmacological and toxicological implications.

Br J Clin Pharmacol. Jun;41(6):477-91. Review.

Pasantes-Morales H, Franco R (2002).

Influence of protein tyrosine kinases on cell volume change-induced taurine release.
Cerebellum. Apr;1(2):103-9. Review.

Perez-Gomez J, Bindslev N, Orkand PM, Wright EM (1976).

Electrical properties and structure of the frog arachnoid membrane.

J Neurobiol. May;7(3):259-70

Raab A (2003).

Differentielle Proteomanalyse porciner Hirnkapillarendothelzellen.
Dissertation, TU-Darmstadt.

Ramsby M L und Makowski G S (1999).

Differential Detergent Fractionation of eukaryotic Cells.

In, *Methods in Molecular Biology*, Volume 112, Humana Press, New Jersey.

Rechkammer G (2001).

Funktionelle Lebensmittel - Zukunft der Ernährung oder Marketing-Strategie.

Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe.

<http://www.verbraucherministerium.de/forschungsreport/rep-so-01/food.htm>.

Reyner LA und Horne JA (1997).

Suppression of sleepiness in drivers: combination of caffeine with a short nap.

Psychophysiology. Nov;34(6):721-5.

Reyner LA und Horne JA (2002).

Efficacy of a 'functional energy drink' in counteracting driver sleepiness.

Physiol Behav. Mar;75(3):331-5.

Risau W, Dingler A, Albrecht U, Dehouck MP, Cecchelli R (1992).

Blood-brain barrier pericytes are the main source of gamma-glutamyltranspeptidase activity in brain capillaries.

J Neurochem. Feb;58(2):667-72.

Rubin LL, Hall DE, Porter S, Barbu K, Cannon C, Horner HC, Janatpour M, Liaw CW, Manning K, Morales J (1991).

A cell culture model of the blood-brain barrier.
J Cell Biol. Dec;115(6):1725-35.

Sambrook und Russell (2001).

Molecular Cloning A LABARAORY MANUAL. Third Edition Cold Spring Harbor, New York.

Sanchez del Pino MM, Peterson DR und Hawkins RA (1995).

Neutral amino acid transport characterization of isolated luminal and abluminal membranes of the blood-brain barrier.
J. Biol. Chem. 270, 14913-14918.

Saransaari P, Oja SS (2000).

Taurine and neural cell damage.
Amino Acids. 19(3-4):509-26. Review.

Schaddelee MP, Voorwinden HL, van Tilburg EW, Pateman TJ, Ijzerman AP, Danhof M, de Boer AG (2003).

Functional role of adenosine receptor subtypes in the regulation of blood-brain barrier permeability: possible implications for the design of synthetic adenosine derivatives.
Eur J Pharm Sci. May;19(1):13-22.

Schulenberg B, Beechem JM, Patton WF (2003).

Mapping glycosylation changes related to cancer using the Multiplexed Proteomics technology: a protein differential display approach.
J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. Aug 5;793(1):127-39.

Schuller-Levis GB, Park E (2003).

Taurine: new implications for an old amino acid.
FEMS Microbiol Lett. Sep 26;226(2):195-202.

Schulze C, Smales C, Rubin LL, Staddon JM (1997).

Lysophosphatidic acid increases tight junction permeability in cultured brain endothelial cells.
J Neurochem. Mar;68(3):991-1000.

Scientific Committee on Food (1999).

Opinion on Caffeine, Taurine and D-Glucurono- γ -Lactone as constituents of so-called "energy" drinks.
http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out22_en.html.

Scientific Committee on Food (2003).

Opinion of the Scientific Committee on food on Additional information on "energy" drinks.
<http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf>.

Seelig A, Landwojtowicz E (2000).

Structure-activity relationship of P-Glykoprotein substrates and modifiers.
Eur J Pharm Sci. Nov;12(1):31-40.

Seidl R, Peyrl A, Nicham R, Hauser E (2000).

A taurine and caffeine-containing drink stimulates cognitive performance and well-being.
Amino Acids. 19(3-4):635-42.

Severini G, Diana L, Di Giovannandrea R, Tirelli C, Shasby (1986).

A study of serum glycosidases in cancer.
J Cancer Res Clin Oncol. 121(1):61-3.

Shepro D, Morel NM (1993).

Pericyte physiology.

FASEB J. Aug;7(11):1031-8. Review.**Shuaib A (2003).**

The role of taurine in cerebral ischemia: studies in transient forebrain ischemia and embolic focal ischemia in rodents.

Adv Exp Med Biol. 526:421-31**Silverman JA (1999).**

Multidrug-resistance transporters.

Pharm Biotechnol. 12:353-86. Review.**Smith QR, Stoll J (1988).**

Blood-brain barrier amino acid transport.

In: Pardridge WM, editor. Introduction to the blood-brain barrier.

Cambridge University Press, pp 188–197.**Sole MJ, Jeejeebhoy KN (2002).**

Conditioned nutritional requirements: therapeutic relevance to heart failure.

Herz. Mar;27(2):174-8. Review.**Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA (1986).**

Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia.

J Cell Biol. Sep;103(3):755-66.**Suzuki S, Hayase S, Nakano M, Oda Y, and Kakehi K (1998).**

Analysis of Glucuronolactone and Glucuronic Acid in Drug Formulations by High-Performance Liquid Chromatography.

J. Chromatographic Science 36 (7): 357-360.**Tamai I, Senmaru M, Terasaki T, Tsuji A (1995).**

Na(+)- and Cl(-)-dependent transport of taurine at the blood-brain barrier.

Biochem Pharmacol. Nov 27;50(11):1783-93.**Tamai I, Tsuji A (2000).**

Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain barrier.

J Pharm Sci. Nov;89(11):1371-88.**Tamura S, Tomizawa S, Tsutsumi S, Suguro N, Kizu K (1966).**

Metabolism of Glucuronic Acid in fatigue due to physical exercise.

Jap. J Pharmacol. 16, S.138-156.**Theodore C, Singh SV, Hong TD, Awasthi YC (1985).**

Glutathione S-transferases of human brain. Evidence for two immunologically distinct types of 26500-Mr subunits.

Biochem J. Jan 15;225(2):375-82.**van Dam RM, Feskens EJ (2002).**

Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus.

Lancet. Nov 9;360(9344):1477-8.

Walaszek Z, Szemraj J, Narog M, Adams AK, Kilgore J, Sherman U, Hanausek M (1997).

Metabolism, uptake, and excretion of a D-glucaric acid salt and its potential use in cancer prevention.

Cancer Detect Prev. 21(2):178-90.

Ward RJ, Kest W, Bruyeer P, Lallemant F, De Witte P (2001).

Taurine modulates Katalase, aldehyde dehydrogenase, and ethanol elimination rates in rat brain.

Alcohol Alcohol. Jan-Feb;36(1):39-43.

Weimer V (2002).

Feed the brain - Nahrungsmittel für das Gehirn.

Diplomarbeit, TU-Darmstadt.

Westbrook JA, Yan JX, Wait R, Welton SY, Dunn MJ (2001).

Zooming-in on the proteome: very narrow-range immobilised pH gradients reveal more protein species and isoforms.

Electrophoresis. Aug;22(14):2865-71. Review.

WIL (2001b).

A 13-week oral (gavage) toxicity study of D-glucuronolactone in rats. Final Report, December 21, WIL-423001. WIL Research Laboratories Inc., Ohio, USA.

Submitted to the European Commission by Red Bull GmbH, Brunn 115, A-5330 Fuschl am See, Austria, 31 December 2001.

Yuan X, Desiderio DM (2002).

Protein identification with Teflon as matrix-assisted laser desorption/ionization sample support.

J Mass Spectrom. May;37(5):512-24.

Zhang W und Chait BT (2000).

ProFound-An expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information.

Analytical Chemistry, 72: 2482-89.

Zuo X, Speicher DW (2002).

Comprehensive analysis of complex proteomes using microscale solution isoelectrofocusing prior to narrow pH range two-dimensional electrophoresis.

Proteomics. Jan;2(1):58-68.

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumenanteil pro Volumen
(w/v)	Massenanteil pro Volumen
μ	Mikro (10^{-6})
Ω	Ohm
2D-PAGE	Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese
A	Ampère
ACN	Acetonitril
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BMEC	Hirnkapillarendothelzellen (<i>brain microvascular endothelial cells</i>)
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosin-5'-monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHAPS	3-[(Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-Propansulfat
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMF	Dimethylformamid
DOC	Deoxycholsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
Em.	Emission
ESI	Elektrospray-Ionisation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ex.	<i>Excitation</i> (Anregung)
f	Femto (10^{-15})
g	Erdbeschleunigung; Gramm
h	Stunde(n)
HPLC	Hochflüssigkeitschromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
IPG	immobilisierter pH-Gradient
kDa	Kilodalton
m	Milli (10^{-3})
M	Molar
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight
min	Minute(n)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
n	Nano (10^{-9})
NBT	Nitro Blue Tetazolium
p	Pico (10^{-12})
p.a.	per analysis (Analysequalität)
PBS	Phosphat-gepuffertes Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
P_e	endothelial Permeabilitätskoeffizient [cm/s]
pI	Isoelektrische Punkt
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)-dinatriumsalz
PMF	Peptide Mass Fingerprint
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMP	1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolon

ppm	parts per million
RP	<i>reverse phase</i>
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
s oder sec	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAUT	Taurin-Transporter
TEER	<i>transendothelial electric resistance</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Units
UV	Ultraviolett
V	Volt
vWF	von Willebrand Faktor = Faktor VIII-assoziiertes Antigen

Anhang

Lebenslauf

Name	Patrick Pankert	
Geburtstag	30.05.1975	
Geburtsort	Frankfurt/Main	
Schulausbildung	1981 - 1985	Gartenstadtschule, Nieder-Roden (Grundschule)
	1985 - 1987	Heinrich-von-Böll-Schule, Nieder-Roden (Gesamtschule)
	1987 - 1991	Georg-Büchner-Schule, Jügesheim (Gymnasium)
	1991 - 1994	Claus-von-Stauffenberg-Schule, Dudenhofen (Oberstufe)
	1994	Abitur
Akademische Ausbildung	1994 - 2000	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt
	2000	Diplomprüfung Diplomarbeit bei Frau Prof. Dr. F. Pfeifer an der Technischen Universität Darmstadt
	2000 - 2004	Promotionsarbeit bei Herrn Prof. Dr. H. G. Gassen an der Technischen Universität Darmstadt
Auslandsaufenthalt	1996 - 1997	Studium der Biologie am Trinity College Dublin, Irland

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Hans Günter Gassen an der Technischen Universität Darmstadt am Clemens Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie in der Zeit von Dezember 2000 bis Dezember 2003 angefertigt.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Weiterhin erkläre ich, dass ich bisher keinen Versuch unternommen habe, an einer deutschen oder ausländischen Universität zu promovieren.

Darmstadt, den 16.12.2003

(Patrick Pankert)